

**EPIZOOTIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS
VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS VIRUS DER
AUJESZKY'SCHEN KRANKHEIT IN SEREN UND BLUTELUATEN
THAILÄNDISCHER SCHWEINE MITTELS
ELISA ("ENZYGNOST", BEHRING),
SERUM-NEUTRALISATIONS-TEST UND
"AUJESZKY-LATEX-KIT" (IFFA MERIEUX).**

PISAMAI LEAMCHARASKUL

Disbui. München

1989

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Gothe

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. E. Munz

*Epizootiologische Untersuchungen zum Nachweis
von Antikörpern gegen das Virus der
Aujeszky'schen Krankheit in Seren und Bluteluaten
thailändischer Schweine mittels
ELISA ("Enzygnost", Behring),
Serum-Neutralisations-Test und
"Aujeszky-Latex-Kit" (Iffa Merieux).*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Pisamai Leamcharaskul
aus
Bangkok, Thailand

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Munz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einführung und Überblick

2. Zielsetzung

2.1.	Allgemeines Ziel: Zielsetzung und Zwecksetzung	1
2.1.1.	Ziel: Zielsetzung	2
2.1.2.	Allgemeines Ziel: Zielsetzung	3
2.1.3.	Zielsetzung: Zielsetzung	4
2.1.4.	Zielsetzung: Zielsetzung	5
2.1.5.	Zielsetzung: Zielsetzung	6
2.1.6.	Zielsetzung: Zielsetzung	7
2.1.7.	Zielsetzung: Zielsetzung	8
2.1.8.	Zielsetzung: Zielsetzung	9
2.1.9.	Zielsetzung: Zielsetzung	10
2.1.10.	Zielsetzung: Zielsetzung	11

2.2.	Zielsetzung: Zielsetzung	12
2.2.1.	Zielsetzung: Zielsetzung	13
2.2.2.	Zielsetzung: Zielsetzung	14
2.2.3.	Zielsetzung: Zielsetzung	15
2.2.4.	Zielsetzung: Zielsetzung	16
2.2.5.	Zielsetzung: Zielsetzung	17
2.2.6.	Zielsetzung: Zielsetzung	18
2.2.7.	Zielsetzung: Zielsetzung	19
2.2.8.	Zielsetzung: Zielsetzung	20
2.2.9.	Zielsetzung: Zielsetzung	21
2.2.10.	Zielsetzung: Zielsetzung	22
2.2.11.	Zielsetzung: Zielsetzung	23
2.2.12.	Zielsetzung: Zielsetzung	24
2.2.13.	Zielsetzung: Zielsetzung	25
2.2.14.	Zielsetzung: Zielsetzung	26
2.2.15.	Zielsetzung: Zielsetzung	27
2.2.16.	Zielsetzung: Zielsetzung	28
2.2.17.	Zielsetzung: Zielsetzung	29
2.2.18.	Zielsetzung: Zielsetzung	30
2.2.19.	Zielsetzung: Zielsetzung	31
2.2.20.	Zielsetzung: Zielsetzung	32

2.3.	Zielsetzung: Zielsetzung	33
2.3.1.	Zielsetzung: Zielsetzung	34
2.3.2.	Zielsetzung: Zielsetzung	35
2.3.3.	Zielsetzung: Zielsetzung	36
2.3.4.	Zielsetzung: Zielsetzung	37
2.3.5.	Zielsetzung: Zielsetzung	38
2.3.6.	Zielsetzung: Zielsetzung	39
2.3.7.	Zielsetzung: Zielsetzung	40
2.3.8.	Zielsetzung: Zielsetzung	41
2.3.9.	Zielsetzung: Zielsetzung	42
2.3.10.	Zielsetzung: Zielsetzung	43
2.3.11.	Zielsetzung: Zielsetzung	44
2.3.12.	Zielsetzung: Zielsetzung	45
2.3.13.	Zielsetzung: Zielsetzung	46
2.3.14.	Zielsetzung: Zielsetzung	47
2.3.15.	Zielsetzung: Zielsetzung	48
2.3.16.	Zielsetzung: Zielsetzung	49
2.3.17.	Zielsetzung: Zielsetzung	50
2.3.18.	Zielsetzung: Zielsetzung	51
2.3.19.	Zielsetzung: Zielsetzung	52
2.3.20.	Zielsetzung: Zielsetzung	53

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1. Einleitung und Problemstellung</u>	1
<u>2. Schrifttum</u>	2
<u>2.1. Allgemeines über Thailand und seine Landwirtschaft</u>	2
2.1.1. Zur Bevölkerung	3
2.1.2. Allgemeines zum Klima	4
2.1.3. Tierische Produktion	4
2.1.4. Überblick über die Thaiadministration, die mit der landwirtschaftlichen Entwicklung befaßt ist	6
2.1.5. Allgemeines zum Personal des Departments of Livestock Development (DLD)	8
2.1.6. Allgemeines zur Schweineproduktion und -haltung	9
<u>2.2. Aujeszky'sche Krankheit (AK) des Schweines</u>	11
2.2.1. Wesen, Bedeutung und Ätiologie	11
2.2.2. Pathogenese und Klinik der AK	11
2.2.3. Antikörperklassen	12
2.2.3.1. IgM-Antikörper	14
2.2.3.2. IgG-Antikörper	14
2.2.3.3. IgA-Antikörper	14
2.2.3.4. IgE und IgD-Antikörper	14
2.2.4. Antikörperkinetik nach Infektion mit dem Virus der AK	14
2.2.5. Zur Diagnose von AK	15
2.2.5.1. Direkte Erregernachweise durch Isolierung	15
2.2.5.2. Nachweis von Virusantigen	16
2.2.5.3. Indirekte Erregernachweise	16
<u>2.3. Prinzipien der serologischen Labordiagnostik</u>	17
2.3.1. Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	17
2.3.2. Serum-Neutralisations-Test (SNT)	19
2.3.3. Vergleichende Untersuchungen über die Verwendung von SNT und ELISA im Rahmen der Routinediagnostik	20
2.3.4. Vergleich eines Latexagglutinations-Testes (LT) mit dem SNT und einem ELISA	23
2.3.5. Verwendung von auf Filterpapier getrockneten Blutproben für serologische Untersuchungen	23

<u>2.4.</u>	<u>Verbreitung der AK - Darstellung der Seuchenlage - wirtschaftliche Bedeutung</u>	25
2.4.1.	Verbreitung, Bedeutung und Nachweis der AK in Thailand	25
2.4.2.	Die Bekämpfung der AK in Thailand durch Impfungen	28
2.4.3.	Gesetzliche Bestimmungen zur Bekämpfung der AK in Thailand	29
<u>3.</u>	<u>Material und Methoden</u>	30
<u>3.1.</u>	<u>Herkunft und Gewinnung des Untersuchungs- materials (Serum- und Blutproben)</u>	30
3.1.1.	Entnahme der Blutproben	30
3.1.2.	Gewinnung des Serums	31
<u>3.2.</u>	<u>Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)</u>	32
3.2.1.	Methodik	33
3.2.2.	Arbeitsvorschrift	34
3.2.3.	Bewertung	35
<u>3.3.</u>	<u>Serum-Neutralisations-Test (SNT)</u>	36
3.3.1.	Methodik	36
3.3.2.	Arbeitsvorschrift	37
3.3.3.	Bewertung	38
<u>3.4.</u>	<u>Latexagglutinations-Test (LT)</u>	39
3.4.1.	Methodik	39
3.4.2.	Arbeitsvorschrift	39
3.4.3.	Bewertung	40
<u>4.</u>	<u>Versuche und Ergebnisse</u>	41
<u>4.1.</u>	<u>Auswahl geeigneter Filterpapiere</u>	41
<u>4.2.</u>	<u>Untersuchungen zur prinzipiellen Eignung des Enzygnost-ELISAs für die Auswertung von Trockenblutproben</u>	43
4.2.1.	Auswahl geeigneter Pufferlösungen	43
4.2.2.	Untersuchungen zur Ermittlung der optimalen Elutionszeit bei Raum- temperatur und bei 37°C	43
4.2.3.	Der Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Antigen- Antikörperbindung	45

4.2.4.	Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe der Eluate	46
4.2.5.	Versuche zur Reduktion unspezifischer Extinktionen bei der Auswertung von Vollblut-Eluaten im ELISA	46
<u>4.3.</u>	<u>Vorversuche für die Anwendung des Serum-Neutralisations-Testes (SNT) und des Latexagglutinations-Testes (LT) zur Untersuchung von getrockneten Vollblutproben</u>	48
4.3.1.	Vorversuche für die Anwendung des SNTs	48
4.3.2.	Vorversuche für die Anwendung des LTs	48
<u>4.4.</u>	<u>Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse</u>	50
4.4.1.	Ergebnisse der Untersuchung von 805 Serum- und 805 korrespondierender Blutproben im Enzygnost-ELISA (Behring)	50
4.4.2.	Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen im SNT und ELISA	51
4.4.3.	Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen im LT (Iffa Merieux), SNT und ELISA	55
4.4.4.	Zusammenfassender Vergleich der Untersuchungsmethoden	60
4.4.5.	Die Ergebnisse der Serum- bzw. Blut-eluatuntersuchungen in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere	60
<u>5.</u>	<u>Diskussion</u>	64
<u>6.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	72
	Summary	73
	Karten	74
<u>7.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	79

ABKÜRZUNGEN

ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid
AGIDT	Agar-Gel-Immun-Diffusions-Test
AK	Aujesky'sche Krankheit
AP	alkalische Phosphatase
AT	Antibiotika-Testblättchen
BHK	Baby-Hamster-Nieren
BSA	bovines Serumalbumin
DLD	Department of Livestock Development
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzyme-Immuno-Assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
E'MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EMIT	Enzyme-multiplied-Immuno-Technique
FAT	Fluoreszenz-Antikörper-Test
FKL	fötale Kälberlungenzellen
FKS	fötales Kälberserum
gI	Glycoprotein I
HAH	Hämagglutinations-Hemmungstest
HEF	Hühnerembryofibroblasten
IFA	indirekter Fluoreszenz-Antikörpernachweis
Ig	Immunglobulin
KBR	Komplementbindungsreaktion
KID 50	50% kulturinfektiöse Dosis
LT	Latexagglutinations-Test
LA	Laktalbumin-Hydrolysat-Lösung
MDBK	bovine Nieren-Zelllinie (Madin Darby Bovine Kidney)
MDT	Microdiluter-Delivery-Tester
OPD	ortho-Phenylendiamin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PK	Schweinenieren-Zelllinie
RIA	Radio-Immuno-Assay
SNT	Serum-Neutralisations-Test
STV	Saline-Trypsin-Versen-Lösung
VP	Verdünnungs-Puffer
W	Whatman
zpE	zytopathischer Effekt

1. Einleitung und Problemstellung

Die Aujeszky'sche Krankheit (AK) bedroht zunehmend die Schweinebestände aller Länder. Dies führt zu wesentlich intensiveren Bekämpfungsmaßnahmen. Für die Diagnose und Feststellung der AK spielen serologische Antikörpernachweise eine wesentlich größere Rolle als die klinische Diagnose und Virusisolierung. Dies liegt in der Herpesvirusnatur des Erregers begründet. Subklinische und latente Infektionen überwiegen bei weitem die apparenten Krankheitsfälle.

Zum serologischen Nachweis der AK benützte man bis vor wenigen Jahren in erster Linie Serumneutralisationsteste (SNT).

Neuerdings haben Tests, die auf der Basis des sogenannten ELISAs (Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay) und auf der Basis eines Latexagglutinations-Testes (LT) beruhen, wegen arbeitstechnischer Vorteile, die zu einer wesentlichen Verkürzung der Untersuchungszeit führen und die Überprüfung einer großen Anzahl von Proben erlauben, eine herausragende Bedeutung erlangt. Dies wird dadurch unterstrichen, daß ELISA-Systeme offizielle Untersuchungsmethoden im Rahmen der deutschen staatlichen Tierseuchenbekämpfung wurden.

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, epizootiologische Erhebungen über das Vorkommen der AK in verschiedenen Provinzen Thailands mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Tests durchzuführen. Hierbei sollte neben der Untersuchung von Seren vor allem geprüft werden, ob dieser Test auch zur Untersuchung von auf Filterpapier angetrocknetem Vollblut verwendet werden kann, um die in entlegenen Gebieten vorliegenden Schwierigkeiten der Materialgewinnung zu erleichtern bzw. zu umgehen. Ein Teil des Untersuchungsmaterials sollte dann auch noch mittels des SNTs und eines ebenfalls kommerziell erhältlichen Latextestes überprüft und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.



2. Schrifttum

2.1. Allgemeines über Thailand und seine Landwirtschaft

Das Königreich Thailand ist mit 514.000 km² ungefähr so groß wie Frankreich oder Spanien. Sein Gebiet erstreckt sich von 20° nördlicher bis zu 5° südlicher Breite und von 97° bis 105° östlicher Länge. Die größte Nord-Süd-Entfernung beträgt ungefähr 1.600 km (etwa die Entfernung Kopenhagen-Neapel), die West-Ost-Entfernung 870 km.

Das Land grenzt an 4 Nachbarstaaten: Birma, Laos, Kambodscha und Malaysia. Thailand wird zu einem Großteil von natürlichen Grenzen umgeben, d.h. es sind zum einen Küsten und zum anderen Berge oder große Flüsse, die die kontinentalen Grenzen bilden. Im Norden ist das Land gebirgig und bietet so wenig Gelegenheit für den modernen Transport. Im Nord-Osten bildet der Fluß Mekong die Grenze zwischen Thailand und Laos. Zwischen Thailand und Kambodscha gibt es nur wenige Grenzübergänge und auch der Nachbarstaat Malaysia im Süden wird zum Teil durch ein Gebirge abgegrenzt. Ein Vergleich mit anderen geophysikalischen Eigenheiten wie Gebirgshöhen und Längen von Flüssen zeigt keine außergewöhnlichen Besonderheiten. Im Norden erheben sich die Berge bis ungefähr 2.500 m. Im Osten werden Höhen von etwa 1.800 m erreicht. Der längste Fluß ist der Mae Nam Chao Phraya mit 850 km, das entspricht ungefähr der Länge der Oder.

Thailand wird in vier geographische Regionen geteilt:

- a) die Zentrale Ebene,
- b) der Norden,
- c) der Süden und
- d) der Nord-Osten.

Eine 5. Region bildet Bangkok, es wird aber - da es in landwirtschaftlicher Hinsicht oder in Bezug auf die tierische Produktion keine Bedeutung hat - der Zentralen Ebene zugerechnet. Vereinfacht ausgedrückt, reicht die Zentrale Ebene von den Bergen des Nordens bis zum Golf von Thailand. Die nördliche Region wird von den Bergen gebildet. Die Südregion ist ein Teil der langgezogenen Halbinsel, zu der auch Birma und Malaysia gehören. Die nord-

östliche Region umfaßt das Korat-Plateau vom Mekong-Fluß bis zu den Hügeln im Osten.

Abgesehen von den Regenfällen und vom Mekong-Fluß gibt es noch zwei weitere Flüsse, die die Hauptquelle für die Bewässerung im Nordosten darstellen. Eine ganze Anzahl von kleineren Flüssen haben ihren Ursprung im Norden und Nord-Westen und bilden schließlich den Mae Nam Chao Phraya und den Mae Klong. Dieses Flußsystem ist verantwortlich für den fruchtbaren Boden und das beeindruckende Bewässerungssystem in den Tälern. Im Süden gibt es nur wenige kleinere Flüsse, aber die tropischen Monsunregen versorgen dieses Gebiet mit genügend Wasser für landwirtschaftliche Zwecke. Reis ist mit Abstand der wichtigste Anbau- und Ausfuhrartikel.

2.1.1. Zur Bevölkerung

1980 hatte Thailand ungefähr 47 Millionen Einwohner, d.h. 92 Einwohner pro km². Die am dichtesten bevölkerte Region ist die Zentralebene mit 104.000 km² und 146 Einwohnern pro km². Die nördliche Region bedeckt 170.000 km², hat aber nur eine Bevölkerungsdichte von 57 Einwohnern pro km². Der Nordosten ist 168.800 km² groß und hat ungefähr 95 Einwohner pro km². Die südliche Region ist annähernd 71.000 km² groß mit 82 Einwohnern pro km². Die größte Bevölkerungsdichte befindet sich in Bangkok, wo etwa 6 Millionen Einwohner leben. Aufgrund der Ansiedlung zahlreicher Industrien ist auch die Umgebung der Stadt meistens dicht besiedelt. Die größte Bevölkerungsdichte auf dem landwirtschaftlichen Sektor wird in den Reisanbaugebieten, d.h. in den Tälern der großen Flüsse, in Zentral-Thailand und im Norden gefunden. Die bergigen Regionen haben einen weniger fruchtbaren Boden und sind nur dünn besiedelt.

Von den Erwerbstätigen Thailands sind etwa zwei Drittel in der Landwirtschaft beschäftigt. Die durchschnittliche Farmgröße liegt jedoch unter 2,4 ha. Die Bauern sind oft sehr arm, 40% sind noch Pächter von Land, welches Großgrundbesitzern gehört.

2.1.2. Allgemeines zum Klima

Thailand liegt im Bereich der tropischen Monsune, die das Klima weitgehend bestimmen. Von Mai bis Oktober - das ist die Zeit des Südwestmonsuns - gelangen feuchte Luftmassen nach Thailand. Dies führt zu starken Regenfällen. Zeitweilige Überflutungen und unpässierbare Straßen sind die Folgen. Insbesondere auf dem Lande macht sich das nachteilig bemerkbar.

Von Oktober bis April bestimmt ein trockener Nordostmonsun das Klima. Während dieser Zeit steigen die Tagestemperaturen erheblich an, sie können über 40°C im Schatten erreichen.

Generell gilt noch, daß der Nordosten weitaus heißer und trockener ist als die übrigen Landesgebiete. Die Küsten haben ein ausgeglichenes Klima.

Die Klimaverhältnisse bedingen, daß die landwirtschaftlichen Voraussetzungen des zentralen Teiles des Landes weitgehend durch das Schwemmland der großen Flüsse beeinflußt werden. Hier befinden sich ideale Reisanbaugebiete und auch andere Formen der landwirtschaftlichen Nutzung. Nur in den trockeneren Gebieten wird auch Zuckerrohr, Mais, Baumwolle, Gemüse und Obst angebaut. Erst in den höher gelegenen Gebieten gibt es Wald, er bedeckt fast 40% der Landfläche Thailands. Während im zentralen und nördlichen Landesteil der tropische Monsunwald vorherrscht, findet man im Süden tropischen Regenwald und an den Küsten Mangrovenwälder.

2.1.3. Tierische Produktion

Die nachfolgenden Angaben basieren im wesentlichen auf den Statistiken des Departments of Livestock Development (DLD).

Verteilung der Nutztierpopulationen

Für die Krankheitskontrolle ist es wichtig, die Verteilung der Tiere im Land zu wissen. Genauso wertvoll oder unabdingbar ist es auch, genauere Vorstellungen über die Anzahl der Tiere zu haben. Eine dichte Population bedeutet ein höheres Risiko für die Ausbreitung von Krankheiten. Auf der anderen Seite werden aber

Krankheiten auch leicht durch Tiertransporte vom Gebiet der Produktion in die Gebiete des Verbrauchs über große Distanzen verbreitet.

Thailand ist in 9 tierärztliche Regionen geteilt, die einen sehr unterschiedlichen Tierbesatz (Jahresbericht des DLDS, April 1988) haben. Die größte Zahl der Rinder (Gesamtpopulation ca. 4,5 Mio.) befindet sich im Nord-Osten des Landes, nämlich in der Region 3 (siehe Karte Nr. 1). In den Regionen 4, 5, 6, 7 und 9, bzw. im Norden, im Nord-Westen und im Westen der Zentralebene, werden ähnliche Zahlen festgestellt wie im Süden. Die entsprechenden Rinderzahlen im Osten der Zentralebene und im nördlichen Teil der südlichen Halbinsel sind viel niedriger.

Die Verteilung der Wasserbüffel (Gesamtpopulation ca. 4,4 Mio.) ist sehr unregelmäßig. Ungefähr 75% der Büffelpopulation werden in den Regionen 3 und 4 im Nordosten des Landes gefunden.

Auch die Verteilung der ca. 6 Mio. Schweine ist sehr unregelmäßig. Am wenigsten Schweine gibt es in der Region 9, dem äußersten Süden des Landes, weil dort der größte Teil der Bevölkerung Moslems sind. Die größte Besatzdichte wird in der Region 5, d.h. im südwestlichen Teil der Zentralregion gefunden. Die anderen tierärztlichen Regionen haben unterschiedlich große Schweinepopulationen (siehe Karte Nr. 2 und Tabelle 1).

Veterinärgebiet	Schweinepopulation 1988 (Durchschnitt Feb.- Apr.)
1	428737
2	1005087
3	790980
4	398887
5	649610
6	404211
7	1795723
8	225200
9	130255
Summe	5828690

Tabelle 1: Verteilung der Schweinepopulation in den 9 Veterinärgebieten Thailands.

Auf die Anzahl und Verteilung der Ziegen und Schafe sowie des Geflügels in Thailand soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

Erwähnenswert ist noch, daß auf den Farmen der Kleinbauern die Menschen in engem Kontakt mit ihren Tieren leben. Sie brauchen die Tiere auch für die Arbeit in den Reisfeldern, lassen sie in der Nähe der Dörfer grasen oder füttern sie auch dort. Deshalb ist die höchste Populationsdichte an Schweinen und Rindern in den fruchtbaren Ebenen der Flußtäler, aber auch in den Küstenregionen des Südens, die mehr Regen haben, zu finden.

2.1.4. Überblick über die Thaiadministration, die mit der landwirtschaftlichen Entwicklung befaßt ist.

Thailand ist administrativ in 73 Provinzen (siehe Karte Nr. 2) eingeteilt. Die Provinzen gliedern sich in 716 Distrikte mit 6.160 Gemeinden, zu denen 55.000 Dörfer gehören. 70% der Bevölkerung Thailands lebt in ländlichen Gebieten.

Von den 14 Ministerien der Thairegierung sind 4 mit der Entwicklung ländlicher Gebiete befaßt. Das sind:

- a) das Innenministerium,
- b) das Erziehungsministerium,
- c) das Gesundheitsministerium und
- d) das Ministerium für Landwirtschaft und Kooperative.

Im folgenden wird noch kurz auf die Verwaltungsorgane eingegangen, die mit der tierischen Produktion befaßt sind. Das Ministerium für Landwirtschaft und Kooperative besteht aus 4 Hauptabteilungen und 9 Abteilungen (Departments). Eins der sog. Departments ist das Dept. of Livestock Development (DLD). Es leitet dem Minister für Landwirtschaft und Kooperative direkt entsprechende Informationen zu und unterstützt ihn in seinen Entscheidungen.

Die Aufgaben des DLDs können wie folgt charakterisiert werden:

- a) Initiierung und Koordination von Programmen für die Verbesserung der landwirtschaftlichen Tierzucht;
- b) Forschung auf dem Gebiet der tierischen Produktion, Ernährung und auf dem Krankheitssektor;

- c) Impfstoff-, Sera- und Antigenherstellung, sowohl für den landeseigenen Gebrauch, als auch für andere Länder;
- d) tierärztliche bzw. diagnostische Dienste;
- f) Registration und Kontrolle der tierärztlichen Praktiker und der Viehhändler;
- g) Registration und Kontrolle der Qualität von Lebensmitteln tierischen Ursprungs;
- h) Kontrolle der Tiergesundheit und Aufsicht über die Seuchentilgung.

Das DLD ist in 13 Abteilungen unterteilt, welche entweder in Bangkok oder als Regional-, Provinz- und Distrikt-Abteilungen auf dem Land lokalisiert sind. Die Regional-Beamten beaufsichtigen die Provinz-Verwaltungen und letztere wiederum die Distrikte. Die Beamten der Regionen unterstehen direkt dem Generaldirektorium des DLDs.

Diagnostische, veterinärmedizinische Zentren (Veterinary Research and Diagnostic Laboratory Centers) gibt es in Khon Kaen, Lampang und Thung Song. Sie unterstehen der Abteilung für Tiermedizinische Forschung (Veterinary Research Division) des DLDs. Das virusdiagnostische und impfstoffproduktionstechnische Zentrum befindet sich in Pakchong und untersteht der Abteilung für Veterinärbiologie (Veterinary Biologics Division) des DLDs. Die für die Tiermedizin wichtige Abteilung für Krankheitskontrolle (Division of Disease Control) ist in folgende Sektionen eingeteilt:

- a) Administration,
- b) Seuchentilgung,
- c) Quarantänestationen für Tiere und
- d) Öffentliches Veterinärwesen.

Die Aufgaben der Sektion für Seuchentilgung und der für Quarantänestationen gehen über die Krankheitskontrolle hinaus, da sie auch für die Kontrolle des Exportes und Importes von Tieren zuständig sind. Das Öffentliche Veterinärwesen ist auf Grund entsprechender gesetzlicher Vorschriften verantwortlich für die Qualität der tierischen Produkte, die exportiert werden sollen. Für den Verkauf von tierischen Produkten innerhalb des Landes ist das Ministerium für Inneres zuständig.

Die Bekämpfung der Seuchen, welche in einer für Thailand geltenden Liste (Animal Epidemic Act B.E. 2499) aufgeführt sind, ist eine der Hauptaufgaben der "Division of Disease Control".

Folgende Institutionen befassen sich außer dem DLD mit der Kontrolle von Krankheiten der Tiere:

- a) Die Armee, sie ist für ihre eigenen Tiere voll verantwortlich;
- b) das Innenministerium, es ist für die Fleischbeschau für den Verbrauch in Thailand selbst, für die allgemeine Lebensmittelkontrolle und für die Ausgabe von Identifikationszeugnissen für Tiere zuständig;
- c) das Ministerium für Öffentliche Gesundheit, es ist für Zoonosen verantwortlich, wobei zu bemerken ist, daß Krankheiten wie Tollwut, Leptospirose und Trichinose sowohl vom Gesundheitsministerium als auch vom DLD bearbeitet werden.

Erwähnenswert ist noch, daß Thailand eine große Industrie für die Herstellung von Futtermitteln besitzt, die zahlreiche Tierärzte beschäftigt. Diese Tierärzte machen auch Konsultationen bei Schweinehaltern - in der Regel werden allerdings nur Großbetriebe (als solche gelten, die ca. mehr als 100 Schweine haben) betreut -, sie verkaufen importierte Arzneimittel und Impfstoffe und führen Impfungen aus. Der Import von Impfstoffen muß allerdings vom DLD genehmigt sein.

2.1.5. Allgemeines zum Personal des Departments of Livestock Development (DLD)

Das DLD hatte 1983 insgesamt 7320 Mitarbeiter. Davon waren im tierärztlichen Bereich tätig:

- 420 als Tierärzte,
- 290 in der tierischen Produktion,
- 70 in der Wissenschaft,
- 27 in sonstigen Bereichen, z.B. in der Finanzabteilung und
- 2.262 sogen. "Paraveterinarians".

In Thailand gab es 1984 insgesamt etwa 1.600 qualifizierte Tierärzte, die an den 2 Fakultäten in Bangkok studiert hatten. Solche, die nicht im Regierungsdienst sind, arbeiten als Allgemeinpraktiker in den Städten, als Berater für die Nahrungs- und

Futtermittelindustrie oder sie sind bei der Armee, beim Innenministerium, beim Gesundheitsministerium oder einem anderen Ministerium für Lebensmittel oder dgl. zuständig.

Die Tierärzte und Paraveterinarians, die vom DLD beschäftigt werden, sind wie folgt in Thailand verteilt: In der zentralen Administration, in der Forschung und in der Diagnostik an den verschiedenen Untersuchungsämtern gibt es ungefähr 700. Außerdem arbeiten 9 als regionale "Livestock-Officers" und 73 als "Provinz-Livestock-Officers", das ergibt mit entsprechender Assistenz ungefähr 170 Tierärzte und Paratierärzte. Dazu kommen noch in 716 Distrikten 1.220 "Distrikt-Livestock-Officers" und zusätzliches Personal (ca. 600 Personen), das in Tierkliniken, bei der künstlichen Besamung, in Quarantänestationen und in mobilen Veterinäreinheiten arbeitet (von Kruedener, 1985).

2.1.6. Allgemeines zur Schweineproduktion und -haltung

Abgesehen von den Kleinbauern in den Dörfern gibt es sehr große kommerzielle Schweinefarmen, die nach modernen Gesichtspunkten und unter guten Hygieneverhältnissen betrieben werden. Sie werden von tierärztlichen Beratern der Nahrungs- und Futtermittel-industrie betreut. Die Betriebe von Bauern, die nur wenig Schweine besitzen, werden tierärztlich praktisch kaum versorgt. Die Aufmerksamkeit der Kleinbauern gilt auch mehr den Tieren, die sie zur Arbeit im Reisfeld verwenden können, weniger den Schweinen. Fachkenntnisse zur Prophylaxe und Bekämpfung von Krankheiten sind kaum vorhanden. Die Schweinehaltung in den Dörfern ist nicht kommerziell orientiert und es werden keine Investitionen vorgenommen. Da die Bauern selbst für Impfungen bezahlen müssen, scheuen sie diese Ausgaben vor allem dann, wenn die Preise für Schweine niedrig sind.

Sowohl die Rinderproduktion als auch die Schweineproduktion ist in den letzten Jahren konstant geblieben. Mit der Verbesserung der Fleischqualität und der Schlachthofhygiene gibt es jedoch Anzeichen für einen zunehmenden Bedarf an Schweinefleisch, - evtl. sogar für den Export -, der durch die Versorgungsmöglichkeit mit landeseigenem Futter auch befriedigt werden könnte.

Folgende Schweinerassen kommen in Thailand am häufigsten vor: Duroc, Largewhite und "Landrace". Reinrassige Tiere werden zur Zucht verwendet. Kreuzungen, sog. Hybride, unterschiedlichen Grades, dienen zur Mast. Diese Kreuzungstiere wachsen schneller und gelten als widerstandsfähiger als reinrassige Tiere.

2.2. Aujeszkysche Krankheit (AK) des Schweines

2.2.1. Wesen, Bedeutung und Ätiologie

Die AK ist im Prinzip eine akute, fieberhafte Virusallgemeinerkrankung bei Säugetieren. Ihre Symptome sind durch zentralnervöse Störungen, respiratorische Erscheinungen und vor allem durch einen starken Juckreiz charakterisiert. Das Schwein gilt als Hauptwirt der Erkrankung, bei ihm verläuft die AK als zyklische Allgemeinerkrankung (Rolle und Mayr, 1984). Die AK wird auch als Morbus Aujeszky, als Pseudorabies, Pseudowut, "Infectious Bulbar Paralysis" und als "Mad Itch" (Juckseuche) bezeichnet.

Die AK wird durch das porcine Herpesvirus Typ 1 hervorgerufen, es gehört zur Familie der Herpetoviridae, Subfamilie Alphaherpesvirinae. Seine Größe beträgt ungefähr 150-170 nm. Das Virus hat ein kubisch-symmetrisches Nukleokapsid, das eine doppelsträngige DNS enthält. Es ist von 162 Untereinheiten, sog. Kapsomeren, umgeben. Zwischen einzelnen Isolaten des Erregers existieren z.T. erhebliche biologische Unterschiede, die sich insbesondere auf ihre Virulenz und ihren Organotropismus auswirken. Wie alle Herpesviren ist auch das Aujeszkysche Virus gegenüber Umweltbedingungen und chemischen und physikalischen Einflüssen relativ stabil. Es wird nicht mit allen gebräuchlichen Desinfektionsmitteln inaktiviert.

2.2.2. Pathogenese und Klinik der AK

Hauptüberträger des Erregers sind inapparent erkrankte Schweine und evtl. Ratten, die das Virus mit Se- und Exkreten ausscheiden. Haupteintrittspforte für das Virus ist der Nasen-Rachenraum. Bei empfänglichen Tieren beträgt die Inkubationszeit zwischen einem Tag und maximal drei Wochen. Ort der ersten Virusvermehrung ist das lymphatische Gewebe, speziell die Tonsillen. Von hier aus breitet sich das Virus über Nervenbahnen, aber auch auf lymphogenem und hämatogenem Wege aus, wobei sich das Virus auch in weißen Blutkörperchen vermehrt. Im Gefolge der Generalisation kommt es zu ausgedehnten Organmanifestationen, wobei besonders

im Zentralen Nervensystem virusbedingte Veränderungen entstehen. Ein Charakteristikum der AK ist, daß die Krankheitserscheinungen vom Alter der Tiere beeinflußt werden. Im allgemeinen gilt, daß ältere Schweine milder erkranken bzw. die Infektion verläuft bei älteren Tieren symptomlos (Eich, 1983). Am gefährlichsten ist die AK für Saugferkel, bei denen sie i.d.R. als akute bis perakute, tödlich verlaufende Gehirn- und Rückenmarksentzündung imponiert. Erregungerscheinungen wie Zwangsbewegungen, Ataxien und Krämpfe werden hierbei beobachtet.

Zentralnervöse Erscheinungen wie depressives Verhalten, Koordinationsstörungen, klonische Krämpfe, Zwangsbewegungen und Lähmungen werden auch noch bei 4-6 Wochen alten Ferkeln beobachtet. Die Erkrankung verläuft bei 60-80% der betroffenen Tiere tödlich, wobei der Tod innerhalb von wenigen Tagen eintritt (Rolle und Mayr, 1984). Ein sehr vielfältiges Symptomenbild wird bei 3-5 Monate alten Schweinen beobachtet. Neben milden Verlaufsformen, die durch respiratorische Symptome, durch Anorexie, Fieber, Konstitutionen und Depression gekennzeichnet sind, werden auch noch zentralnervöse Störungen wie Koordinationsstörungen, Krämpfe, Lähmungen usw. beobachtet, die häufig noch erhebliche Verluste verursachen. Übereinstimmend wird in der Literatur auf eine negative Beeinflussung der Mastleistung bei infizierten Tieren hingewiesen. Außerdem kommt es bei 50% der infizierten trächtigen Sauen zu Aborten zu einem frühen Zeitpunkt der Trächtigkeit. Es werden jedoch auch fötaler Fröhrtod und mumifizierte Früchte als Folgen später Infektionen erwähnt. Nach Schulze et al. (1980) kann eine präpartale Infektion die Geburt lebensschwacher oder toter Ferkel verursachen.

2.2.3. Antikörperklassen

Das AK-Virus stimuliert sowohl zellvermittelte als auch humorale Immunitätsmechanismen. Erstere äußern sich in einer Steigerung der T-Lymphozyten und in einer vermehrten Motilität der Makrophagen. Beide lassen sich ungefähr vom 4. Tag p.i. an nachweisen. Über ihre Dauer weiß man allerdings wenig. Am Ort des Viruseintrittes in das lymphatische Gewebe des Nasen-Rachenraumes scheint

sich eine lokale zellvermittelte Resistenz zu entwickeln, die ca. 3 Monate andauert.

Neutralisierende Antikörper bilden die Basis der humoralen Immunität. Sie sind frühestens ab dem 6. Tag p.i. nachweisbar und erreichen ihre höchsten Titerwerte nach 2 bis 3 Wochen. Nach Kretzschmar (1970) scheint die Belastbarkeit der Immunität nicht in direkter Relation zur Menge der nachgewiesenen neutralisierenden Antikörper zu stehen. Rolle und Mayr (1984) stellen jedoch fest, daß ab einer bestimmten Titerhöhe keine klinischen Krankheitserscheinungen mehr zu beobachten sind. Eine lokale Infektion wird allerdings nicht verhindert. Reinfektion oder Impfungen wirken als Booster-Effekt auf die Bildung von neutralisierenden Antikörpern.

Nach der Infektion mit AK-Virus kommt es auch zur Bildung von komplementbindenden und präzipitierenden Antikörpern. Muttertiere übertragen humorale Antikörper mit dem Kolostrum auf Saugferkel, dabei wird vor allem den neutralisierenden Antikörpern eine wichtige Rolle zugeschrieben. Je nach Menge der mit dem Kolostrum aufgenommenen Antikörper sind Saugferkel etwa 3 bis 4 Wochen oder sogar noch länger vor einem Krankheitsausbruch geschützt. Die Ferkel bilden etwa ab der 1. Lebenswoche IgM, ab der 2. Lebenswoche IgA und ab der 3. Lebenswoche IgG (Mayr et al., 1984; Wittmann, 1984). Nach van den Woldenberg (1985) verhindern die nach der Infektion mit AK-Virus beim Schwein induzierten Immunmechanismen oft die Krankheitseskalation, sie scheinen auch eine Limitierung der Virusausscheidung zu bewirken. Die zeitlich begrenzte Immunität, die eine klinische Erkrankung nach Reinfektionen verhindert, wird auf ca. 18 Monate geschätzt (Eich, 1983). Ungefähr gleich lang werden neutralisierende Antikörper nachgewiesen (Rolle und Mayr, 1984), sie haben jedoch keinen Einfluß auf intrazelluläres Virus (Wittmann et al., 1982). Als charakteristische Herpes-Virus-Infektion muß man auch bei der AK-Infektion mit einer lebenslangen Viruspersistenz rechnen (Rolle und Mayr, 1984).

Folgende Antikörper können nach einer Infektion mit porcinen Herpesviren nachgewiesen werden:

2.2.3.1. IgM-Antikörper

Sie sind die größten Immunglobuline und werden nach einer Infektion mit AK-Virus als erstes gebildet. Nach Kitt (1982) haben sie generell eine hohe Bindungsvalenz und deshalb starke agglutinierende, komplementaktivierende und zytologische Aktivitäten. IgM-Antikörper sind fast ausschließlich im Serum, aber auch in Schleimhautsekreten nachzuweisen. Sie können sich nicht an Zellen binden. Mit dem Erscheinen von IgG-Antikörpern verschwinden allmählich die IgM-Antikörper (Rolle und Mayr, 1984).

2.2.3.2. IgG-Antikörper

Ihnen kommt die größte Bedeutung im Rahmen der humoralen Immunantwort zu. Ihre Serumkonzentration ist zum Zeitpunkt der Geburt am höchsten und ihre Halbwertszeit liegt bei ca. 3 Wochen. Im allgemeinen hält jedoch der durch die IgG-Antikörper vermittelte humorale Schutz gegen eine Infektion mit AK-Virus wesentlich länger an.

2.2.3.3. IgA-Antikörper

Diese Antikörperklasse stellt die wichtigsten spezifischen sekretorischen Schutzmechanismen dar. Sie haben im Serum nur einen Anteil von 10-17%. Ihre Wirkung ist eine antibakterielle und virusneutralisierende, doch werden auch präzipitierende und komplementbindende Eigenschaften nachgewiesen. IGA-Antikörper werden nicht an Zellen gebunden (Rolle und Mayr, 1984). Ihre Wirkung beruht wahrscheinlich darauf, daß sie die Anheftung von Mikroorganismen an die Oberfläche von Schleimhautzellen verhindern.

2.2.3.4. IgE und IgD-Antikörper

Ersteren kommt eine wesentliche Rolle bei anaphylaktischen Reaktionen zu, die Bedeutung der IgD-Antikörper ist noch weitgehend unbekannt. Inwieweit beiden Antikörperklassen bei der AK eine Rolle zukommt, ist noch nicht erwiesen.

2.2.4. Antikörperkinetik nach Infektion mit dem Virus der AK

Nach der Infektion mit AK-Virus werden als erstes IgM-Antikörper (ca. ab dem 4. Tag p.i.) gebildet. Nach dem 7. Tag lassen sich auch IgG-Antikörper nachweisen. Die Infektion mit Feldvirusstämmen induziert deutlich höhere IgG-Titer als eine Impfung. IgM-Antikörper lassen sich nach einer Impfung nur etwa 18 Tage nachweisen. Nach einer natürlichen Infektion werden danach noch

hohe IgM-Titer festgestellt (Rodak et al., 1987). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Snyder et al. (1985). Die Autoren fanden, daß IgM-Antikörper sowohl bei geimpften als auch bei mit Feldvirus-infizierten Tieren ab dem 6. Tag nachgewiesen werden können (ELISA-Technik). Die IgM-Titer erreichten bei beiden Gruppen am 9. Tag ihr Maximum, allerdings zeigen mit Feldvirus infizierte Tiere doppelt so hohe Titerhöhen. Die Autoren stellten auch fest, daß IgG-Nachweise 3 Tage nach dem erstmaligen IgM-Nachweis gelingen. IgM-Antikörper waren 3 Wochen p.vacc. nicht mehr nachweisbar, jedoch IgG-Antikörper.

2.2.5. Zur Diagnose von AK

Eine zweifelsfreie Diagnose der AK beim Schwein ist weder aus den klinischen Symptomen, noch aus den pathologisch-anatomischen Veränderungen zweifelsfrei zu stellen. Die Diagnose muß sich auf den direkten Erreger- bzw. Antigennachweis sowie auf ergänzende serologische Untersuchungen (Antikörpernachweise) stützen.

In der Bundesrepublik sind die Kriterien, die für die Feststellung der AK bzw. für den Verdacht auf Ausbruch der AK erfüllt sein müssen, in einer Verordnung zum Schutze gegen die Aujeszky'sche Krankheit erfaßt (Bundesgesetzblatt I, S. 488, 1980 bzw. BGBl I, S. 1287, 1983).

2.2.5.1. Direkte Erregernachweise durch Isolierung

Das Virus der AK läßt sich in einer Vielzahl von primären Säugetierzellkulturen, im embryonierten Hühnerei und in Zelllinien unter Ausbildung eines deutlichen zytopathischen Effektes ohne Schwierigkeiten anzüchten. Zellkulturen sind jedoch die Methode der Wahl bei der Virusisolierung. Als Versuchstiere können weiße Mäuse und Kaninchen in Ausnahmefällen noch in Betracht kommen.

2.2.5.2. Nachweis von Virusantigen

Der Nachweis von Virusantigen wird i.d.R. mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen von Gefrierschnitten von Tonsillen, Lymphknoten, Gehirn oder Rückenmark durchgeführt. Die Untersuchungen bieten keine 100%ige Sicherheit, so daß in Verdachtsfällen die Virusisolierung in Zellkulturen noch versucht werden muß.

2.2.5.3. Indirekte Erregernachweise

Der indirekte Erregernachweis wird über den Nachweis von Antikörpern geführt. Folgende serologische Verfahren stehen zur Verfügung:

- a) Die Komplementsbindungsreaktion (KBR),
- b) der Agargel-Immunodiffusionstest (AGIDT),
- c) der Radio-Immuno-Assay (RIA),
- d) der Serum-Neutralisationstest (SNT),
- e) der Enzyme-linked-Immunosorbend-Assay (ELISA) und
- f) der Latexagglutinations-Test (LT)

In der Routinediagnostik haben die ersten 3 Verfahren keine Bedeutung erlangt. Am wichtigsten sind derzeit der SNT, der ELISA und seit kurzem auch der Latex-Test, insbesondere für Reihenuntersuchungen geworden.

2.3. Prinzipien der serologischen Labordiagnostik

2.3.1. Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mit der Entdeckung des Radio-Immuno-Assays (RIA) durch Yalow und Berson (1959) wurden völlig neue immunologische Techniken unter Verwendung markierter Komponenten entwickelt. Die Methode, die sich zwar durch eine hohe Sensitivität auszeichnet, ist mit den Nachteilen belastet, die sich aus der Verwendung radioaktiver Substanzen ergeben.

Zu Beginn der 70er Jahre versuchten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander und fast gleichzeitig eine ähnlich effektive Nachweismethode zu entwickeln. Mit ihr sollten die oben genannten Nachteile vermieden werden. Deshalb benützten die Autoren anstelle eines Radioisotopes zur Markierung eines Reaktanten von Immunreaktionen ein Enzym.

Die niederländische Gruppe (van Weemen and Schuurs, 1971) nannte ihren Test "Enzyme-Immuno-Assay (EIA)", die schwedische Gruppe (Engvall and Perlmann, 1972) "Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)" und die amerikanische Gruppe (Rubenstein et al., 1972) "Enzyme-multiplied-Immuno-Assay-Technique (EMIT)". Alle drei Verfahren beruhten auf dem gleichen Prinzip. Es konnte jedoch grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Verfahren unterschieden werden, homogenen und heterogenen Enzym-Immun-Testen. Erstere werden vor allem zur Bestimmung von Hormonen, Arzneimitteln oder anderen Substanzen verwendet. Bei den heterogenen Verfahren ist eine Trennung von Antigenen bzw. Antikörpern, die in vitro nicht gebunden wurden, notwendig. Hierbei wird üblicherweise ein Reaktionspartner durch eine physikalische Adsorption an eine sogenannte feste Phase, z.B. bestimmte Kunststoffe, gekoppelt. Nicht gebundene Bestandteile werden von den adsorbierten durch einen Waschvorgang entfernt. Das an die feste Phase von Platten oder Röhrchen gebundene Antigen reagiert spezifisch mit dem in der Untersuchungsprobe befindlichen Antikörper. Nach der anschließenden Inkubation und einem erneuten Waschvorgang erfolgt die Zugabe des Konjugats, ein Enzym-markierter Antikörper, der sich gegen die Immunglobuline der zu untersuchenden Tierspezies richtet. Zur

Markierung werden Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase benützt. Durch Waschen entfernt man nichtgebundene konjugierte Antikörper. Die gebundenen, enzymmarkierten Antikörper werden durch eine chromogene Substanz, das sogenannte "Substrat", sichtbar gemacht. Die Intensität der Farbreaktion ist von der Menge des konjugierten, an den Antigen-Antikörper-Komplex der festen Phase gebundenen Antiserums abhängig und wird optisch bzw. photometrisch bestimmt. Dieses ELISA-Verfahren wird auch als indirekte Methode bezeichnet.

Es gibt eine Reihe von technischen Variationen. Das am häufigsten verwendete Verfahren zum Antikörpernachweis mit dem ELISA ist jedoch die indirekte Methode. Sie zeichnet sich - wie auch die Doppel-Antikörper-Methode (Menz, 1979) - durch hohe Sensitivität und relativ unkomplizierte Durchführbarkeit aus.

Eine wichtige Modifikation des ELISAs zum Antikörpernachweis stellt die Kompetitions- oder Blocking-ELISA-Technik dar. Sie wird in Dänemark zur Untersuchung auf Antikörper gegen AK-Virus verwendet. Hierbei wird das mit Antigen beschichtete System gleichzeitig mit dem zu testenden, möglicherweise Antikörper enthaltenden Serum und mit einem enzymmarkierte Antikörper enthaltenden Konjugat beschickt. Dabei kommt es zu einer Kompetition der Bindungsstellen. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe von Substrat. Dieses setzt sich mit dem Enzym zu einer Farbreaktion um. Bei der photometrischen Auswertung ist darauf zu achten, daß, je höher der Gehalt der zu bestimmenden nicht-enzymmarkierten Reaktanten ist, desto geringer die Enzymaktivität und damit die nachfolgende Farbreaktion ausgeprägt sein wird (es besteht eine negative Korrelation). Bei der Anwendung des ELISA-Sandwich-Verfahrens korreliert dagegen die Farbreaktion mit dem Gehalt des zu bestimmenden Reaktanten positiv.

Das Prinzip des zum Antikörpernachweis üblicherweise benutzten ELISAs folgt der von Engvall u. Perlmann (1972) angegebenen Methodik. Unterschiede und Abweichungen ergeben sich aus der Notwendigkeit, einzelne Reaktionsschritte und Komponenten jeweils für ein neues ELISA-System zu optimieren und zu standardisieren. Daraus resultieren hinsichtlich der Versuchsdurchführung im Detail z.T. erhebliche Abweichungen (Menz, 1979; Meier, 1982;

Rustleben, 1988). Die gleichen Autoren äußern sich auch über die Auswertungsmöglichkeiten des ELISAs und insbesondere zum Auftreten und zur Problematik von unspezifischen Hintergrundreaktionen bei diesem Test und der Bedeutung der entsprechenden Kontrollen.

2.3.2. Serum-Neutralisations-Test (SNT)

Dieser Test basiert auf der Neutralisation der Infektiösität eines Virus durch spezifische, im Serum enthaltene Immunglobuline.

Werden in vitro eine bestimmte Anzahl infektiöser Viruspartikel mit einer bestimmten Menge von homologen Antikörpern zusammengebracht, dann kommt es bei Einhaltung geeigneter Inkubationsbedingungen zu einer Bindung der Antikörper an die infektiösen Viruspartikel und zu ihrer nachfolgenden Neutralisation. Diese Neutralisation muß anschließend durch Verimpfung der Gemische auf virusempfindliche Wirtssysteme, i.d.R. Zellkulturen, nachgewiesen werden. Eine Neutralisation stellt sich dann durch Ausbleiben eines zytopathischen Effektes dar. Sie wird durch einen Vergleich zwischen der Infektiösität des Virusausgangsmaterials und der Reaktionsgemische gemessen. Eine Reihe von Faktoren beeinflussen die Reproduzierbarkeit der Serumneutralisationsteste. Von Bedeutung sind hierbei die verwendeten Zellsysteme und Medien, die Virusstämme und die Temperatur- und Zeitverhältnisse. Große Bedeutung kommt neben der Zelladaptation des Virus auch der Zahl der Passagen einer Zelllinie zu.

Wittmann et al. (1987) verglichen zum Nachweis von AK-Antikörpern einen SNT, bei dem das Virus-Serumgemisch über 24 Stunden bei 37°C inkubiert worden war mit einem SNT, bei dem das Virus-Serumgemisch nur ein bis zwei Stunden bei 37°C (Kurzinkubation) inkubiert wurde. Im Rahmen eines Ringversuches konnte hierbei festgestellt werden, daß die Langzeitinkubation der Kurzzeitinkubation überlegen ist. Dies ergab die Testung von stark, mittel und schwach positiven Schweineseren durch mehrere Untersuchungsstellen. Nach Wittmann et al. (1987) spielt jedoch die Höhe der serumneutralisierenden Antikörper für die routineserologische Diagnostik keine Rolle. Bedeutsam ist nur, daß schwach positive Seren erkannt werden. Virus-Serumgemische, die nur ein bis zwei Stunden lang inkubiert worden waren, zeigten meist negative Ergebnisse, selbst dann, wenn die positive Titterschwelle auf 1:2 festgelegt wurde. Dehnten jedoch die verschiedenen Testlabors die

Inkubationszeit auf 24 Stunden aus, so wurden in allen Laboratorien solche Seren als positiv erkannt. Die Autoren sprechen sich deshalb für eine Langzeitinkubation der Virus-Serumgemische aus. Außerdem empfehlen sie beim Test schwach positive Referenzseren als Indikatoren für die Empfindlichkeit mitlaufen zu lassen. Strittig ist, ob Grenztiter von 1:2 als falsch positiv beurteilt werden, bzw., ob Seren bei einem Titer von 1:4 als falsch negativ beurteilt werden können. Die gleichen Autoren schlagen deshalb vor, den Empfehlungen von Forschner et al. (1981) dahingehend zu folgen, daß ein Serum mit der Verdünnung 1:2 dann als negativ anzusehen sei, wenn eine Zweituntersuchung zu einem bestimmten späteren Zeitpunkt nicht mindestens einen Titeranstieg auf 1:4 feststellen läßt. In Einzelfällen kann auch hierbei eine falsche Beurteilung erfolgen. Sie dürfte jedoch eher vertretbar sein, als wenn bei Seren, die einen Titer von 1:2 erkennen lassen, etwa 1-2% falsch positive Reagenten erfaßt werden. Am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen in Oberschleißheim wird derzeit nach Gerbermann (pers. Mitt., 1988) wie folgt verfahren:

Die zu untersuchenden inaktivierten Serumproben werden in den Verdünnungen 1:2 bis 1:128, das immer mitgeführte Kontrollserum nur in der Verdünnung 1:2 in Mikrotiterplatten untersucht. Das Virus-Antigen wird in einer Konzentration von 100 KID 50 / 25 µl in jede Plattenvertiefung zugegeben. Für den Nachweis eines zytopathischen Effektes werden fötale Kälberlungenzellen verwendet.

2.3.3. Vergleichende Untersuchungen über die Verwendung von SNT und ELISA im Rahmen der Routinediagnostik

Im Rahmen der Routinediagnostik ist der SNT das ältere Verfahren. Es hat den Nachteil, daß mit einem aktivem Virus gearbeitet werden muß. Dies kann zu Schwierigkeiten bei der Standardisierung führen. Eine sehr hohe Sensitivität wird dem SNT nicht zugeschrieben (Gustafson, 1975). Problematisch ist es auch, wenn im Positiv-Negativ-Grenzbereich beurteilt werden soll (vgl. oben). Hinzu kommt, daß der SNT hinsichtlich Zeit-, Arbeits-, und Kostenaufwand als nicht gering zu beurteilen ist. Ein weiterer

Nachteil besteht darin, daß manche Seren zytotoxische Eigenschaften besitzen und somit nicht verwertet werden können.

Moutou et al. (1978) entwickelten einen indirekten ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die AK. In einem Blindversuch wurden 103 Serumproben von 22 mit AK-Virus infizierten Schweinen untersucht. Gleichzeitig überprüften sie die Seren im SNT. Sie fanden, daß die Ergebnisse des ELISAs gut mit denen des SNTs korrelierten und stellten dabei fest, daß erstgenannter das sensitivere Verfahren darstellte. Außerdem war der Test gut reproduzierbar und in weniger als 6 Stunden durchführbar.

Die Ergebnisse konnten durch Briaire et al. (1979) bestätigt werden. Einen indirekten ELISA führten sie in Polystyrolröhrchen und Mikrotiterplatten aus, ohne daß sie unterschiedliche Ergebnisse erhielten. Beim Nachweis postvaccinaler Antikörper und kurze Zeit nach einer Infektion stellten sie eine höhere Sensitivität des ELISAs im Vergleich zu einem indirektem Immunofluoreszenz- und Serumneutralisationstesten fest.

Forschner et al. (1981) überprüften einen kommerziell erhältlichen ELISA-Test ("Enzygnost", Fa. Behring, Marburg) zum Nachweis spezifischer Antikörper im Vergleich zum SNT. Sie testeten mit beiden Methoden 769 verschiedene Serumproben und fanden größtenteils eine Übereinstimmung der positiven und negativen Befunde. Bei 748 Seren konnten die Untersuchungsergebnisse im SNT durch den ELISA bestätigt werden. Die 21 Ausnahmen lagen alle an der unteren Nachweisgrenze der Verfahren. Die Autoren bezeichnen den ELISA als "Todsystern", das leichter standardisierbar sei und geringere Ansprüche an die Qualität des Untersuchungsmaterials stelle als der SNT. Die Untersuchungszeit sei dabei wesentlich kürzer. Sie heben als weitere positive Eigenschaft dieses alternativen Untersuchungssystems dessen hohe Empfindlichkeit und geringen Investitionsaufwand hervor und bemerken, daß nicht nur Blut bzw. Serum, sondern auch Organmaterial (Leberaufsaft) zur Untersuchung geeignet ist. Zu den Ergebnissen des SNTs finden die Autoren eine positive Korrelation (Rangkorrelations-Koeffizient nach Spearman (r_s) = 0,76).

Eine der Voraussetzungen für die Bekämpfung der AK, ist die Feststellung und Ausmerzung von Antikörper-positiven Schweinen in latent infizierten Beständen. Für derartig umfangreiche serologische Untersuchungen ist der ELISA besser geeignet als der SNT. Moennig et al. (1981) untersuchten ebenfalls mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Test und dem SNT die zeitliche Entwicklung der Antikörper-Bindung bei 7 Ferkeln. Sie fanden eine deutliche Übereinstimmung und konnten außerdem feststellen, daß 14 Tage p.i. fast alle Seren sich als positiv erwiesen. Im Vergleich zum SNT war der ELISA jedoch sensitiver, er zeigte meist 4-7 Tage früher eine Antikörperbildung an. Die Autoren überprüften außerdem 471 Seren aus norddeutschen Schweinebeständen mit beiden Testverfahren. Sie fanden in 97,2% eine Korrelation, die ELISA-Titer lagen jedoch i.d.R. höher als die SNT-Titer.

Bei positiven Seren fanden Durham et al. (1985) in 96,9% eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des SNTs und ELISAs, bei negativen Seren sogar eine Übereinstimmung zu 99,7%. Sie konnten eine positive Korrelation von 0,916 zwischen den im ELISA gemessenen Positivwerten und den entsprechenden SNT-Titern feststellen.

Damit sind die Untersuchungen von Snyder und Stuart (1977) im wesentlichen bestätigt. Diese Autoren stellten in ihrer qualitativen Bewertung ("positiv" oder "negativ") eine Übereinstimmung von 98,3% fest. Sie fanden unter 3094 untersuchten Seren im ELISA 1,02% und im SNT 0,96% positive Reagenten. Noch mehr für den Einsatz des ELISAs sprechen die Ergebnisse von Afshar et al. (1986), die im Vergleich zum SNT eine bis zu 9,12-fach erhöhte Sensitivität feststellten. Der Test könnte wie der SNT auch zum erstmaligen Nachweis von Antikörpern bei intranasal infizierten Schweinen verwendet werden und diesem überlegen sein.

Lugovic et al. (1987) sowie Wolde Senbet (1982) stimmen in der Bewertung überein, daß der ELISA hinsichtlich Spezifität, Sensitivität und Technik der Durchführung dem SNT überlegen ist. Letztere Autoren finden eine Korrelation der Ergebnisse zu 98,7%.

Nach Banks und Cartwright (1983) sind auch die Immunelektrophorese und der Mikroimmundiffusionstest dem ELISA nicht gleichwertig.

2.3.4. Vergleich eines Latexagglutinations-Testes (LT) mit dem SNT und einem ELISA

Von Wilson und Schipper (1983) wurde ein LT mit dem SNT verglichen. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß der LT die einfachere und schnellere Methode ist, dessen Sensitivität bzw. Spezifität im Vergleich zum SNT jedoch nur bei 88 bzw. 90,6% liegt. Die Autoren gaben allerdings zu bedenken, daß diese Werte von der Globulin-Fraktion, vom Antikörpertiter und vom Reinheitsgrad der verwendeten Virussuspension und der Serum-Antikörper abhängen.

Vor kurzem wurde dann der von der Firma Iffa Merieux angebotene LT mit einem ELISA verglichen (Informationen zum LT, 1988, Fa. Iffa Merieux GmbH). Die erzielten Ergebnisse des LTs entsprachen den ELISA-Ergebnissen, lediglich bei sehr schwach reagierenden Seren, die auch vom ELISA nur gerade noch erkannt werden, war eine Agglutination erst nach den angegebenen 6 Minuten erkennbar und wurde somit mit "unspezifisch" bewertet.

2.3.5. Verwendung von auf Filterpapier getrockneten Blutproben für serologische Untersuchungen

Über die Verwendung von Filterpapieren zur Erleichterung der Materialgewinnung liegen umfangreiche Untersuchungen vor. Bereits in den 50er und 60er Jahren haben verschiedene Autoren über Antikörper-Nachweise von verschiedenen Infektionskrankheiten anhand von auf Papier getrockneten Blutproben berichtet (Adams and Hanson, 1956; Worth, 1964; Chin et al., 1966).

Neben den von diesen Autoren verwendeten Methoden wie Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) und SNT wurde der Antikörpernachweis auch mit dem IFA (indirekter Fluoreszenz-Antikörpernachweis) (Anderson et al., 1961; Kimber and Burrridge, 1972; Bruce-Chwatt et al., 1973; Burrridge and Kimber, 1973), dem RIA (Radio-Immuno-

Assay) (Farzadegan et al., 1978; Zhuang et al., 1982; Zoulek et al., 1985) und dem ELISA (Hassane, 1983; Sander und Niehaus, 1984; Afshar et al., 1987; Caillé, 1987) durchgeführt.

Über den Nachweis von Antikörpern gegen die AK mittels der Filterpapiermethode wurde erstmals von Banks (1985) berichtet. Er verwendete hierfür Whatman-Nr.1 Papier zur Probennahme und PBS mit 0,05% Tween 20 zur Elution des Blutes. Der Antikörpernachweis erfolgte mit dem indirektem ELISA. Der Autor vergleicht dabei die Ergebnisse der Bluteluat mit denen von Seren und kommt unter Vernachlässigung dreier Ausnahmen zu einer 100%igen Korrelation, wobei jedoch die Reproduzierbarkeit bei der Untersuchung von Seren im ELISA besser war als jene bei der Untersuchung von Bluteluaten.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Toma et al.(1986), die das gleiche Papier und die gleiche Elutionslösung verwendeten. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Serumuntersuchung ermittelten sie eine Spezifität bzw. Sensitivität der Bluteluatuntersuchung im ELISA von 100 bzw. 90%.

Ebenso kamen Oliver et al. (1987) zu einer 100%igen Übereinstimmung der Ergebnisse von Bluteluat- und Serumproben sowohl im ELISA als auch im SNT. Beim Vergleich der Ergebnisse der Serumuntersuchungen im ELISA und im SNT konnte man eine Übereinstimmung von 99,2% errechnen.

Eloit et al. (1987) berichteten von vergleichenden Untersuchungen mittels des ELISA-Kits der Firma Behring. Auch sie kommen zu guten Ergebnissen beim Vergleich der Bluteluat mit den entsprechenden Serumproben (Spezifität 100%, Sensitivität 98%).

2.4. Verbreitung der AK, - Darstellung der Seuchelage- wirtschaftliche Bedeutung

Die AK gehört zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Viruserkrankungen der Schweine. Ihr Vorkommen ist weltweit. Die Zunahme der AK brachte man hauptsächlich mit Strukturänderungen in der Schweineproduktion in Zusammenhang. Der Trend zu Großbetrieben mit hohen Tierzahlen führte bisher ganz allgemein zu einer starken Zunahme der Seuchenausbrüche. Die diesbezüglichen Verhältnisse für die Bundesrepublik hat jüngst Rustleben (1988) dargestellt. Nachfolgend soll auf die Verhältnisse in Thailand eingegangen werden:

2.4.1. Verbreitung, Bedeutung und Nachweis der AK in Thailand

Auch in Thailand ist die AK eine der wirtschaftlich bedeutendsten Viruserkrankungen der Schweine. Zum ersten Mal wird der Ausbruch der Krankheit 1977/78 beobachtet und beschrieben (Sunyasootcharee et al., 1978).

Die Autoren berichten von einem mit hoher Morbidität und Mortalität verlaufenden Ausbruch der Krankheit bei Ferkeln im Alter bis zu 2 Wochen. Die Diagnose wurde pathologisch, histopathologisch, tierexperimentell und ultrahistologisch gestellt. Der befallene Bestand lag in der Provinz Nakhonpathom.

Auch in den folgenden Jahren wurde von diesen Autoren über Ausbrüche der AK in Thailand berichtet. Die Befunde konnten von Kongsmak et al. (1980) und Riengrojgitak et al. (1982) bestätigt werden. Als zusätzliche Untersuchungstechnik führten Sunyasootcharee et al. (1980) den Fluoreszenzantikörpertest (FAT) ein, wobei zum einen Gehirnakklatschpräparate und zum anderen Gefrierschnitte der Tonsillen untersucht wurden. Nach Sunyasootcharee et al. (1980) war letztere Methode der ersteren überlegen. Kongsmak et al. (1980) beschrieben die Diagnose der AK durch Virusisolation in PK 15-Zellkulturen und anschließendem Nachweis im FAT bzw. SNT. Hierzu diente das Gehirn gestorbener Schweine, bei denen der Verdacht auf AK vorlag, als Untersuchungsmaterial. Beim ersten Ausbruch der AK in Thailand 1977

stellte sich heraus, daß die Krankheit auf importierte Schweine zurückging, die wahrscheinlich Virusträger waren. Der Ausbruch von AK in Thailand wurde auch von Tanticharoenyos et al. (1981) bestätigt, die nochmals darauf hinwiesen, daß besonders 3 bis 15 Tage alte Ferkel betroffen waren. Die klinischen Symptome bestanden überwiegend in hohem Fieber, Anorexie, Erbrechen und Krämpfen. Der Nachweis der Krankheit wurde pathologisch, histopathologisch, serologisch (FAT, SNT), auf der Chorioallantoismembran von 10 Tage alten embryonierten Hühnereiern und durch Tierversuche (Kaninchen, Mäuse) gesichert.

Riengrojgitak et al. (1982) beobachteten Kerneinschlußkörperchen im Kleinhirn von 7 Tage alten Ferkeln, die mit dem Verdacht auf AK verendet waren. Der Nachweis wurde auch elektronenmikroskopisch geführt.

Kortheerakul et al. (1984) berichteten, daß Kaninchen sehr geeignet sind, um mit Gehirnsuspensionen von verdächtigen Tieren subkutan mit Erfolg infiziert zu werden. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 4 Tagen entwickelt sich Juckreiz und die Tiere sterben.

Die Vermutung, daß die AK in Thailand weit verbreitet sein könnte, wurde durch serologische Untersuchungen mittels Antikörpernachweis in Neutralisationstesten Anfang der 80iger Jahre bestätigt, wenn auch die Anzahl der Proben relativ klein war. Hierzu wurden Seren aus den verschiedensten Provinzen an das DLD, "Veterinary Research Division", geschickt. Es konnte festgestellt werden, daß in 16 von 24 Proben aus der Provinz Kamphaengphet bzw. 19 von 20 aus Chanthaburi bzw. 2 von 6 aus Ratburi bzw. 1 von 14 aus Chonburi bzw. 9 von 92 Proben aus Lampang neutralisierende Antikörper enthalten waren (Pinyochon et al., 1983).

Berichte über das Vorkommen von AK in Schweinen aus den südlichen Provinzen Thailands, nämlich aus Suratthani, Songkhla, Phangnga, Narathiwat, Phatthalung bzw. Ranong stammen aus den Jahren 1982-1985 (Antarasena et al., 1987). Der Erreger wurde in BHK 21-Zellen isoliert und mit dem FAT identifiziert, die Serum-Neutralisationsteste wurden nach der Methode von Hill et al. (1977) durchgeführt. Positive Antikörperbefunde gab es in 4 von 14

Proben aus der Provinz Songkhla bzw. in 19 von 40 aus Phangnga bzw. in 9 von 9 aus Narathiwat bzw. in 35 von 71 aus Phatthalung und in 4 von 81 aus Ranong. Die Proben stammten von Mutterschweinen und Zuchtebern.

Außerdem wird im Jahresbericht des DLDs von 1985 festgestellt, daß von Oktober 1984 bis September 1985 243 (47,37%) von 513 Serumproben aus dem Zentralgebiet Thailands Antikörper gegen AK enthielten.

Von Parchariyanon et al. (1984) wird über die Untersuchung mittels direktem FAT (Methode nach Hill et al., 1977) von Hirnrindenabklatschpräparaten, Kryostatschnitten von Gehirn und Tonsillen und Deckglas-Zellkulturen berichtet. Für letztere wurden PK 15-, MDBK- und BHK 21-Zellen verwendet und diese mit einer 10%igen Organsuspension aus Gehirn oder Tonsillen infiziert. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß frische Hirnrindenabklatschpräparate für eine schnelle und bequeme Untersuchung am besten geeignet sind, wobei jedoch Erfahrungen mit der Auswertung von Fluoreszenz-Antikörper-Testen erforderlich sind.

Die ersten Erfahrungen mit der Anwendung des Enzyme-linked-Immunsorbent-Assays (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen AK in Schweineseren in Thailand wurde von Kongsmak (1984) gemacht. Als Antigen und Konjugat dienten mit AK-Virus infizierte bzw. nicht-infizierte PK 15-Zellen bzw. Antischwein-Immunglobulin G von Ziegen, das mit Meerrettichperoxidase (Sigma) nach der Methode von Nakane und Kavaai (1974) konjugiert war. Eine indirekte ELISA-Technik nach der Methode von Voller et al. (1979) wurde durchgeführt. Als Substrat diente ortho-Phenylendiamin (OPD) in Hydrogenperoxid und Zitrat-Phosphatpuffer, pH 5,0. Die Extinktionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die Extinktionsunterschiede zwischen positiven und negativen Kontrollantigenen wurden bewertet. Die Ergebnisse der Untersuchungen von 500 Schweineseren im "Southern Veterinary Research and Diagnostic Laboratory Center" in Thung Song wurden mit ELISA- und Serum-Neutralisationstesten verglichen. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden. Die Autoren schlugen vor, zukünftige Antikörperuntersuchungen mittels ELISA durchzuführen.

Satra (1986) berichtete ebenfalls über die Anwendung der ELISA-Technik zum Nachweis von Antikörpern gegen AK Virus. Diese Untersuchungen wurden zum einen am "National Institute of Animal Health of Japan" und zum anderen am "The Nippon Institute of Veterinary Science" durchgeführt. Bei ersteren dienten virusinfizierte bzw. nicht infizierte PK 15-Zellen als Antigen, enzymgebundenes Antiimmunglobulin G vom Schwein als Konjugat und OPD als Substrat. Die Reaktionen wurden bei einer Wellenlänge von 492 nm ausgewertet und die Diagnose aufgrund der Extinktionsunterschiede gestellt. Am zweiten Institut wurde gereinigtes AK Virus verwendet, das auf BHK-Zellen vermehrt wurde. Protein A mit Enzym und ABTS wirkten als Konjugat bzw. Substrat. Die Messung der dreifach angesetzten Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm und die Extinktionen der mit Antigen beschichteten Näpfe konnten direkt ausgewertet werden, da die Autoren davon ausgingen, daß sie unspezifische Reaktionen bereits durch die Verwendung von gereinigtem Virusmaterial und Protein A annähernd ausgeschlossen hatten. Die Ergebnisse wurden in dieser Veröffentlichung nicht näher beschrieben.

Seit 1987 gibt es keine weiteren einschlägigen Veröffentlichungen, die sich mit der Verbreitung der AK in Thailand befassen.

2.4.2. Die Bekämpfung der AK in Thailand durch Impfungen

Nach Literaturangaben ergibt sich folgendes, sicher unvollständiges Bild:

Die Impfung der Schweine gegen AK ist freiwillig. Sie wird jedoch seit 1980 zunehmend praktiziert. Im allgemeinen wird eine Impfung bei Zuchtschweinen alle 6 Monate und eine oder zwei Injektionen für Absatzferkel empfohlen. Es werden nur kommerziell erhältliche Impfstoffe verwendet, inaktivierte Vakzinen sind üblich und werden auch von den meisten Schweinehaltern benutzt. Die Impfungen scheinen bei regelmäßiger Anwendung zu einem Rückgang der Ausbrüche zu führen. Wegen der hohen Kosten der Impfstoffe werden jedoch meist nur Zuchtschweine vakziniert. Dies erklärt die Zunahme von Ausbrüchen besonders in Mastanstalten. Kommt es trotz-

dem oder erneut zu Ausbrüchen, so wird geimpft und dadurch anscheinend die Ausbreitung der Krankheit und die Schwere der klinischen Symptome vermindert (Sunyasootcharee, 1982). Zu Beginn der 80iger Jahre (Sunyasootcharee, 1981) wurden hauptsächlich folgende Impfstoffe verwendet:

Anti-Aujeszký-Vakzine ("Geskyvac") (Laboratoire Roger, Bellon, S.A., Frankreich), Pseudorabies-Vakzine (Salsbury Laboratories, USA), "PR-VAC" (Norden Lab. Inc., USA) und "PANKYVAC" (Laboratories, Sobrine, S.A., Spanien).

Die Impfungen müssen jedoch regelmäßig durchgeführt werden und sind somit sehr teuer. Nach Sunyasootcharee (1983) ist eine langfristige Tilgung der Krankheit durch Impfungen nicht möglich. Der Autor empfahl deswegen, daß im Rahmen von Prophylaxemaßnahmen serologische Untersuchungen (Serumneutralisationsteste und Agargelimmundiffusionsteste) verwendet werden sollten und für seropositive Tiere die Schlachtung angeordnet werden sollte. Nur seronegative Schweine sollten in die Bestände eingeführt werden.

2.4.3. Gesetzliche Bestimmungen zur Bekämpfung der AK in Thailand

Die Bekämpfung der AK ist in Thailand nicht gesetzlich geregelt. Die Krankheit ist zur Zeit noch nicht in der Liste des "Animal Epidemic Act B.E. 2499" aufgeführt und gehört somit nicht zu den staatlich bekämpften Seuchen.

3. Material und Methoden

3.1. Herkunft und Gewinnung des Untersuchungsmaterials (Serum- und Blutproben)

Alle 805 miteinander korrespondierenden Blut- und Serumproben - sie stammten demnach vom selben Tier - wurden in den Monaten Februar, März und April 1988 von Schweinen, die in Farmen unterschiedlichster Größe in 26 Provinzen Thailands standen, entnommen (vgl. Karte Nr. 3). Die Erlaubnis zur Blutentnahme konnte nur von solchen Besitzern erhalten werden, die die Mitarbeiter des DLDS persönlich kannten.

Die Blutentnahme erfolgte nur von solchen Tieren, die klinisch gesund erschienen, eine Auswahl nach Alter, Geschlecht und Rasse war nicht möglich. Ungefähr die Hälfte der Spendertiere stand in Kleinfarmen (bis zu 100 Schweine) von sogenannten "Smallholders", bei denen häufig schlechte hygienische Verhältnisse vorlagen. Befriedigende Haltungsbedingungen konnten i.d.R. nur in einigen der kommerziellen Großbetriebe (bis zu über 1000 Schweine) festgestellt werden.

Anhand eines Fragebogens wurde versucht, näheres über die Schweinehaltung des Betriebes und über die Vorgeschichte der Tiere zu erhalten, wobei besonderes Interesse darauf gelegt wurde, zu erfahren, ob die Tiere geimpft oder nicht geimpft waren und woher sie stammten. Es muß allerdings darauf verwiesen werden, daß die diesbezüglichen Aussagen nur von bedingter Zuverlässigkeit sind, da die Fragebögen zum Teil nicht oder nur unvollständig ausgefüllt worden sind.

3.1.1. Entnahme der Blutproben

Blut wurde mittels Spritze aus der gestauten Jugularvene entnommen und sofort auf eine Hälfte eines quadratischen Stückes Filterpapier (4 x 4,6 cm², Microdiluterdeliverytester 25µl, Dynatech, Schweiz) getropft. Das Blut wurde soweit aufgesaugt, daß i.d.R. bis zu drei Viertel des Filterpapierquadrates getränkt waren. Die Tier- und Farmnummer und das Datum der Blutgewinnung

wurden auf einen freigebliebene Rand des übrigen Filters geschrieben und anschließend die Proben in ein Diapositiv-Magazin gestellt, wo sie trocknen konnten und zugleich gegen Fliegen geschützt waren. Bei Raumtemperatur oder in klimatisierten Räumen dauerte die Trocknung bei geöffnetem Magazin ca. 10-12 Stunden, im Freien, insbesondere bei hoher Luftfeuchtigkeit, dauerte sie wesentlich länger. Technische Hilfsmittel zum schnelleren Trocknen, wie z.B. Ventilatoren, standen nicht zur Verfügung. Nach dem Trocknen wurden die Filterpapiere in einem Plastikbeutel bei Umgebungstemperaturen von tagsüber mehr als 22°C bis zu 10 Wochen aufbewahrt und nach der Rückkehr ins Zentrallabor in Bangkok bzw. München bei Raumtemperatur gelagert. Mit bloßem Auge waren Veränderungen wie Schimmelpilzbildungen etc. nicht zu beobachten.

3.1.2. Gewinnung des Serums

Abgenommenes und geronnenes Blut wurde spätestens nach 8 Stunden abzentrifugiert, das Serum in Portionen zu 2 ml abgefüllt und bei mindestens -8°C eingefroren. Der Transport der Proben von Bangkok nach München erfolgte in Behältern mit Trockeneis und die anschließende Lagertemperatur betrug -20°C.

3.2. Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der "Enzygnost-Aujeszký" der Firma Behring-Werke AG, Marburg, eingesetzt. Das Prinzip des Testes basiert auf folgenden, von der Herstellerfirma angegebenen Prinzipien:

Der in der Probe gesuchte Antikörper verbindet sich mit dem Antigen auf der Testplatte. Mit diesem Komplex reagiert das Enzym-Konjugat. Nach Zugabe der Substratlösung entsteht durch enzymatische Spaltung ein gelb-grüner Farbstoff. Nicht gebundene Reaktanten werden durch Waschprozesse entfernt.

Der Enzygnost-Aujeszký-Test besteht aus folgenden Teilen bzw. Reagenzien:

- a) Testplatte, aus 6 Riegeln in einem Halterahmen bestehend; jeder Riegel besitzt 2x8 Reaktionsvertiefungen, wobei jeweils eine Reihe mit Antigen und die nächste Reihe mit Kontroll-Antigen beschichtet ist. Antigen und negatives Kontroll-Antigen werden aus Herpesvirus-suis-infizierten bzw. nicht infizierten Baby-Hamster-Nierenzellkulturen (BHK 21-Zellen) gewonnen und vor der Beschichtung inaktiviert.
- b) Positives Schweinekontrollserum, lyophilisiert, 0,5 ml, mit Titerangabe.
- c) Antischwein-Immunglobulin/AP-Konjugat, wird durch Koppelung von alkalischer Phosphatase (AP) mit hochaviden Antikörpern vom Kaninchen hergestellt. Es wird vom Werk die für die jeweilige Charge gültige Gebrauchsverdünnung angegeben.
- d) In der Packung sind ferner enthalten: Substrat-Tabletten (para-Nitrophenylphosphat) und Substrat-Puffer (100 ml Di-äthanolamin und 102 mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (0,5 mmol) pro Liter Aqua dest.; pH 9,8) zum Herstellen der Substratlösung; gebrauchsfertiger Verdünnungspuffer (Phosphatpuffer mit 40 ml Tween-20, 0,2 g Natriumazid und Rinderprotein pro Liter; pH 6,8 - 7,2) für Serumproben und Enzym-Konjugat; Waschlösungskonzentrat (20fach konzentrierter Phosphatpuffer mit 200 ml Tween-20 pro Liter); Stopplösung (2N NaOH).

3.2.1. Methodik

Vorbereitende Arbeiten:

Die Testplatte wird der Verpackung entnommen, gekennzeichnet und ca. 5 Min. bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen gelassen. Das positive AK-Kontrollserum wird in 0,5 ml Aqua dest. gelöst und im Anschluß, außerhalb der Testplatte, mit Verdünnungspuffer so weiterverdünnt, daß eine Faktor-2-Stufe unter dem angegebenen Titer getestet werden kann. Die Testung der genauen Titerverdünnung kann nicht empfohlen werden, weil die Testreproduzierbarkeit bei +/- einer Faktor-2-Stufe liegt. Das nachfolgende Schema (Fig. 1) soll dies verdeutlichen.

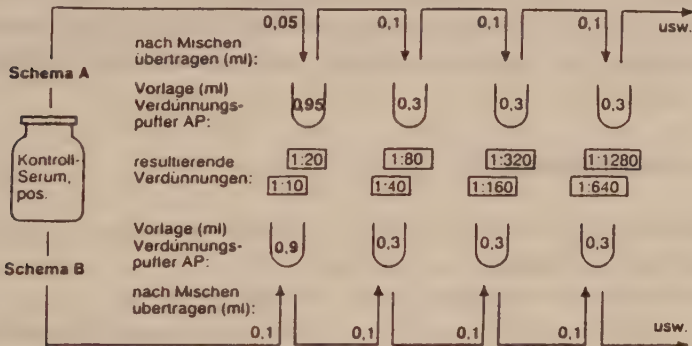


Fig. 1: Verdünnungsschemata für das positive Kontrollserum, außerhalb des Riegels. (Originalangabe Fa. Behring)

Die angestrebte Endverdünnung richtet sich nach dem Titer des Kontrollserums und der Vorlage an Verdünnungspuffer AP in den Reaktionsvertiefungen der Testplatte.

Rechenbeispiel: angegebener Titer 1:2.560; zu testende Serumverdünnung 1:1.280; herzustellende Endverdünnung 1:320, da später im Test hiervon 0,05 ml in Reaktionsvertiefungen mit 0,15 ml vorgelegtem Verdünnungspuffer AP übertragen werden, also Verdünnungsschema A mit 3 Verdünnungsstufen wählen.

Im Anschluß wird das Anti-Schwein-Immunglobulin/AP-Konjugat und die Zusatzreagenzien für Enzygnost laut entsprechender Packungsbeilage vorbereitet.

Es folgt die Vorverdünnung der zu untersuchenden Proben außerhalb des Testriegels. Hierbei wird das Serum 1:11 verdünnt (0,02 ml Probandenserum : 0,2 ml Verdünnungspuffer) und vermischt. Die Blutproben werden wie folgt eluiert und verdünnt: 2 mit einem Bürolocher ausgestanzte Kreise mit angetrocknetem Blut werden in 1056 µl Verdünnungspuffer in einem Eppendorfgefäß 20 Minuten bei 37°C eluiert. Unter Berücksichtigung des Hämatokritwertes entspricht dies einer Serumverdünnung von 1:44. Sowohl die Serum- als auch die Bluteluatproben wurden vorher nicht hitzeinaktiviert.

Es ist darauf zu achten, daß alle Reagenzien, wie z.B. der Verdünnungspuffer, das gebrauchtsverdünnte Enzym-Konjugat und die Substratlösung vor ihrer Verwendung auf +20°C bis 25°C gebracht werden müssen.

3.2.2. Arbeitsvorschrift

Zur Überprüfung (Screening) eines Schweinebestandes genügt es, nur eine Probeverdünnung zu testen.

Die einzelnen Arbeitsgänge laufen wie folgt ab:

- a) Pro Reaktionsvertiefung 150 µl (für die Serumuntersuchung) bzw. 100 µl (für die Bluteluatuntersuchung) Verdünnungspuffer vorlegen,
- b) Einpipettieren von je 50 µl der 1:11 vorverdünnten Serumprobe bzw. je 100 µl Bluteluat in je eine mit Antigen bzw. Kontroll-Antigen beschichtete Reaktionsvertiefung,
- c) Testplatte 1 Stunde bei 37°C in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre inkubieren,
- d) Probenverdünnungen absaugen und mindestens 0,2 ml verdünnte Waschlösung pro Vertiefung einpipettieren. Nach 1 bis 2 Minuten absaugen und diesen Waschvorgang zweimal wiederholen,
- e) pro Vertiefung 0,05 ml gebrauchtsverdünnte Enzym-Konjugat-Lösung zugeben und die Platte wie unter c) beschrieben 1 Stunde inkubieren,

- f) Enzym-Konjugat absaugen und Testplatte wie unter d) beschrieben waschen. 0,1 ml Substratlösung pro Vertiefung zugeben und 30 Minuten bei 37°C und gesättigter Wasserdampfatmosphäre inkubieren,
- g) zum Stoppen der Enzymreaktion 0,05 ml Stopplösung zugeben,
- h) Bewertung der Farbreaktion innerhalb einer Stunde vornehmen.

3.2.3. Bewertung

Zeigt das positive Kontrollserum bzw. das bereits vorher ausgewertete positive Bluteluat eine positive Reaktion, kann der Testansatz wie folgt ausgewertet werden:

Es wird bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen 0,1 ml Substratlösung plus 0,05 ml Stopplösung als unverdünnter Referenzwert direkt in Mikrotiterplatten gemessen (Photometer Titertek Multiskan, Flow Laboratories).

3.3. Serum-Neutralisations-Test (SNT)

In Anlehnung an die Methode des Landesuntersuchungsamtes für das Gesundheitswesen Südbayern wurde der SNT auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt, wobei allerdings die Serumproben nur in 4 Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:8) angesetzt und für jede Verdünnungsstufe eine eigene Serumkontrolle zum Nachweis zytotoxischer Serumeigenschaften mitgeführt wurden. Außerdem wurden nur eine Virusdosis von 50 KID 50/25 μ l verwendet.

3.3.1. Methodik

a) Gefäße

Zur Durchführung des SNTs wurden strahlensterilisierte Flachbodenmikrotiterplatten aus Polystyrol mit 96 Vertiefungen (Falcon 3070, Becton Dickinson & Co., New Jersey, USA) verwendet.

Die Zellzüchtung erfolgte in 175 cm² großen Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) aus Kunststoff.

b) Antigen

Als Antigen diente der Aujeszky-Virus-Teststamm BI4.

Er war nach 6 Passagen in Hühnerembryofibroblasten (HEF) und zehn Passagen in fötalen Kälberlungenzellen (FKL) portioniert und bei -80°C eingefroren worden. Die verwendete Virusdosis betrug 50 KID 50/25 μ l.

c) Serumproben

Zur Entfernung unspezifischer thermolabiler Inhibitoren wurden die Serumproben 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C inaktiviert.

d) Zellkulturen

Die verwendeten FKL wurden bei 37°C mit 5%iger CO₂-Spannung unter gesättigter Wasserdampfatosphäre vermehrt und einmal wöchentlich passagiert. Das Ablösen der Zellen von den Kulturgefäßen erfolgte mit einer sterilen NaCl-Trypsin-Versen-Lösung (STV: physiologische Kochsalzlösung; Trypsin 0,0625%; Versen 0,025%).

Nach einer 10minütigen Zentrifugation (4°C, 100 g) wurde das Zellsediment mit Anzuchtmedium resuspendiert und entweder zur weiteren Zellkultivierung verwendet oder für den SNT auf eine Konzentration von 500.000 Zellen/ml eingestellt.

e) Medien

Die Anzucht der Zellen erfolgte mit Eagle's Minimum Essential Medium, (E'MEM) modifiziert mit Earle's Salzen, Glutamin, 20 mM Hepes und 0,85 g/l NaHCO₃ (pH 7,2-7,4; Flow Laboratories, Meckenheim, BRD). Vor der Verwendung wurde dem Medium 5% fötales Kälberserum (FKS), 5% Laktalbumin-Hydrolysat-Lösung (entsprechend der Methode des Landesuntersuchungsamtes Südbayern in Oberschleißheim) und 0,2% Gentamycin-Lösung (50 µg/ml) zugesetzt. Der Serumanteil beim Erhaltungsmedium wurde auf 1-2% reduziert. Zur Verdünnung der Antigensuspension und der Serumproben diente ebenfalls Anzuchtmedium.

3.3.2. Arbeitsvorschrift

- Jede Serumprobe wird mit Anzuchtmedium im Doppelansatz auf Mikrotiterplatten mit einem Pipettier-Verdünnungsautomaten (Titertek-Autotrop/ Titertek-Medimixer, Flow Laboratories, Meckenheim, BRD) und Eppendorf-Pipetten in 4 Verdünnungen (25 µl/Vertiefung) verdünnt.
- Die Zugabe von 25 µl vorbereitetem Antigen pro Vertiefung erfolgt mit einer Tropfpipette (Dynatech).
- Serumverdünnungen und Virussuspension werden auf einem Mikroplatten-Schüttelgerät (Dynatech) vermischt und dann die Platten bei 37°C 18 bis 24 Stunden in 5%iger CO₂-Spannung unter gesättigter Wasserdampfatosphäre inkubiert.
- 100 µl der auf einem Schüttelgerät (Ika-Vibrax-VXR, Janke & Kunkel GmbH) geschüttelten FKL-Zellen werden mittels "Titer-tek-Autodrop" in jede Vertiefung eingefüllt und die Platten mit selbstklebenden, nicht toxischen Abdichtfolien (Microplate, Flow Laboratories) versiegelt und bis zur Auswertung bei 37°C in 5%iger CO₂-Spannung unter gesättigter Wasserdampfatosphäre inkubiert.

Bei jedem Test laufen folgende Kontrollen mit:

- Positives und negatives Kontrollserum,
- Ansatz der Serumproben ohne Antigen in allen vier Verdünnungen,
- Zellkulturkontrollen in mindestens 8 Vertiefungen unter Verwendung von Anzuchtmedien (50 μ l bzw. 100 μ l pro Vertiefung) und
- Kontrolltitrierungen des Antigens im Dreifachansatz, ausgehend von der Gebrauchsverdünnung bis zur Verdünnung 1:128 mittels Tropfpipette.

Beim Dilutieren wird eine schräge Ebene zur Vermeidung von mechanischen Beschädigungen des Mikrotiterplattenbodens verwendet.

3.3.3. Bewertung

Die Auswertung der Platten erfolgt unter dem Mikroskop 2 bis 7 Tage nach Testansatz. Bewertet wird das Ausbleiben oder Auftreten eines zytopathischen Effektes (zpE) im Vergleich zu den Kontrollen. Der Serumtiter wird nach der Methode von Spearman und Kärber (Bonin, 1973) kalkuliert.

3.4. Latexagglutinations-Test (LT)

Der Test dient zum Nachweis von Antikörpern, die insgesamt gegen das Virus der AK gerichtet sind, wobei sensibilisierte Latexpartikel agglutiniert werden.

Sein Prinzip beruht darauf, daß Latexpartikel, deren Oberfläche mit den Glykoproteinen des Virus bedeckt und damit sensibilisiert wurden, in Gegenwart von Antikörpern Agglutinate bilden.

3.4.1. Methodik

Zur Anwendung kam der "Aujeszky-Latex-Test" (Iffa Merieux), der in anwendungsbereiter Form als sog. Kit käuflich erwerbbar ist. Jeder Testkit enthält folgende Reagenzien:

3 Fläschchen mit insgesamt 3,2 ml Inhalt:

- Flasche a (schwarz gekennzeichnet) enthält 2,2 ml Latexpartikelsuspension (sensibilisiert),
- Flasche b (blau) enthält 0,5 ml gebrauchsfertiges negatives Schweineserum und
- Flasche c (rot) enthält 0,5 ml gebrauchsfertiges positives Schweineserum als Kontrollen.

Zusätzlich sind 10 kartonierte Unterlagen (1 Karton für 6 Reaktionen) zum einmaligen Gebrauch und 30 Stäbchen zum Mischen von Serum- und Latexsuspension beigelegt.

3.4.2. Arbeitsvorschrift

Die Reaktionen des Testes laufen auf den 6 Kreisen der kartonierten Unterlagen ab. In den Kreis C- wird ein Tropfen des Negativkontrollserums, in den Kreis C+ ein Tropfen des positiven Kontrollserums getropft. Je 30 µl der Proben werden in die Kreise 1-4 gegeben. Anschließend wird in alle Kreise ein Tropfen Latexsuspension gegeben und die Reagenten mit einem Stäbchen vermischt. Eine weitere Durchmischung wird durch ein leichtes Schwenken der Unterlagen erreicht.

Mit dem LT konnten sowohl Serumproben, als auch Blutproben untersucht werden. Die Untersuchung der Serumproben erfolgte ent-

sprechend der Gebrauchsanweisung.

Bei der Untersuchung der Blutproben wurde wie folgt vorgegangen: Mit einem Bürolöcher wurden aus einem blutgetränkten Filterpapier 4 Kreise von ca. 5,5 mm Durchmesser ausgestanzt, diese in 240 μ l Verdünnungspuffer (Behring) in einem Eppendorfgesäß getaucht und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Entfernung der Papierkreise entsprach die entstandene hämolytische Lösung unter Berücksichtigung des Hämatokritwertes und der aufgesaugten Vollblutmenge einer Verdünnung des Blutes von 1:5. Diese Berechnung basiert auf den Ergebnissen von Vorversuchen, in denen festgestellt worden ist, daß 0,02 ml Blut (getrocknet) bei einem Hämatokritgehalt von ca. 40% ungefähr 0,012 ml Serum pro Kreis entsprechen. Deshalb wurden 4 Kreise ausgestanzt ($4 \times 12 \mu\text{l} = 48 \mu\text{l}$), die in 240 μ l Puffer gelöst wurden, was einer Serumverdünnung von 1:5 entspricht. Mit dieser Lösung wurde der LT so durchgeführt, als ob Serum getestet werden würde. Ein wesentlicher Unterschied zu den Testungen von Serumproben war, daß die Mischung des Bluteluates mit der Latexpartikelsuspension auf der kartonierten Unterlage fast immer 13 Minuten lang (und nicht 6 Minuten wie bei der Untersuchung von Seren) bis zum Ablesen durchgeführt werden mußte, wobei die Reagenten immer wieder miteinander vermischt werden mußten.

3.4.3. Bewertung

Die Ablesung erfolgt bei Zimmertemperatur. Als positiv gilt, wenn im Vergleich zu den Kontrollen eindeutige Agglutinationen mit dem bloßen Auge zu sehen sind.

4. Versuche und Ergebnisse

4.1. Auswahl geeigneter Filterpapiere

Entsprechend der Aufgabenstellung galt es, ein Filterpapier zu finden, von dem angenommen werden konnte, daß es die Resorption einer konstanten Menge Vollblut bei Umgebungstemperaturen von etwa 30°C und sehr hoher relativer Feuchtigkeit (i.d.R. über 85%) und deren Trocknung innerhalb weniger Stunden erlaubt.

Diese Bedingungen wurden annäherungsweise unter Laborbedingungen bei Verwendung folgender Filterpapiersorten überprüft:

-Chromatographiepapier Whatman No I (W), Fa. Whatman, England,
-Microdiluter Delivery Test (MDT) -Papier für 0,025 ml, Fa.

Dynatech, Schweiz,

-Antibiotika-Testblättchen (AT) mit 6 mm Durchmesser, Fa.

Schleicher und Schuell, Dassel, BRD.

Zur genaueren Bestimmung der Saugfähigkeit der Papiere wurden ca. 4x4,6 cm² große Stücke von W- und MDT-Papier mit gerinnungs-gehemmten Schweineblut getränkt und in einem Diapositivmagazin bei Raumtemperatur (28°C) solange getrocknet, bis sich das Gewicht nicht mehr veränderte (1-3 Tage). Das W-Papier war im voll-gesogenen Zustand von mangelhafter Stabilität. Es klebte an den Wänden der Diapositivschlitze fest und war deshalb unbrauchbar. Das als Blättchen vorliegende AT-Papier mußte auf einer Unterlage (Petrischale) mit Blut getränkt werden. Hierbei kam es zum Kon-takt des blutgetränkten Papiers mit dem Untergrund, sodaß keine konstanten Blutmengen aufgesogen wurden. Deshalb schied auch die-se Papiersorte aus.

Die weiteren Vorversuche wurden deshalb nur mit dem grünlich gefärbten MDT-Papier gemacht.

Zur Feststellung der Volumengröße der aufgesogenen Blutmenge wurde wie folgt verfahren: Mit einem Bürolocher wurden Papier-kreise (Durchmesser 5,5 mm) aus mit und ohne getrocknetem Blut beschichteten Filterpapieren ausgestanzt und bis zur Erreichung eines konstanten Gewichtes jeden Tag gewogen. Gleichzeitig wurden Standardwerte errechnet, wobei Filterpapiere gewogen wurden und diese nach einer Beschickung mit bekannten Mengen an Blut ge-

trocknet und wieder gewogen wurden. Von allen gemessenen Gewichten wurde jeweils der Tagesdurchschnitt errechnet. Jetzt wurde vom Gewicht der getrockneten Kreise das von gleich behandelten Kreisen ohne Blut abgezogen. Die Berechnung unter Berücksichtigung der Standardwerte ergab, daß das MDT-Papier durchschnittlich ein Volumen von 0,02 ml pro Kreis mit 5,5 mm Durchmesser (ca. 25 mm²) aufsaugen kann.

4.2. Untersuchungen zur prinzipiellen Eignung des Enzygnost-ELISAs für die Auswertung von Trockenblutproben

4.2.1. Auswahl geeigneter Pufferlösungen

Geprüft sollte werden, ob sich zwischen der Verwendung der Pufferlösung VP (Behring), 0,5 M NaCl, 1 M NaCl (pH > 6,4) und PBS mit 0,05% Tween 20 (pH 7,0) zur Elution von Trockenblutproben Unterschiede im Extinktionswert der Eluate ergeben.

Es wurde dafür eine Blutprobe herangezogen, deren korrespondierendes Serum in dem nach der vorgeschriebenen Technik durchgeführten ELISA einen Titer von größer/gleich 1:11264 aufwies, also sehr stark positiv reagiert hatte.

Es zeigte sich, daß die unter Verwendung des VPs (Behring) erhaltenen Eluate weniger hohe unspezifische Extinktionswerte anzeigten als dies bei den anderen Pufferlösungen der Fall war.

4.2.2. Untersuchungen zur Ermittlung der optimalen Elutionszeit bei Raumtemperatur und bei 37°C

Aus positiven Serumproben wählten wir 6 Seren aus, deren Nettoextinktionswerte in der Verdünnungsstufe 1:44 1.290, 1.625, 1.850, 0.316, 0.339 und 0.209 waren und die, da Seren mit Extinktionswerten von kleiner als 0,2 als negativ gelten, als stark bzw. schwach positiv eingestuft wurden. Die den Serumproben entsprechenden Bluteluatate der gleichen Tiere (je 2 Papierkreise) wurden 15, 30, 60, 120 Minuten und 15 Stunden (über Nacht) bei Raumtemperatur mit 720 µl VP (Behring) eluiert. Unter Berücksichtigung des Hämatokritwertes, der mit 40% angenommen wurde, errechnete sich daraus eine Serumverdünnung von 1:30. Die Eluate und die entsprechenden Serumproben titrierten wir von Verdünnungsstufe 1:60 (Blutprobe) bzw. 1:44 (schwach positives Serum) bzw. 1:88 (hochpositives Serum) bis zu 1:7.680, 1:5.632 bzw. 1:11.264. Positive und negative Kontrollseren des Testkits liefen parallel. Es ließen sich folgende Titer bestimmen: Schwach positive Seren wurden noch in der Verdünnung 1:44 erfaßt, stark positive Seren hatten Titer von über 1:11.264. Bei den korrespondierenden Blut-

eluaten wurden nur dann positive Werte (bis maximal 1:3.840) gemessen, wenn diese Blutprobe einem stark positiven Serum mit einem ELISA-Titer von über 1:3840 zugehörte. Blutproben, deren korrespondierendes Serum nur schwach positiv oder negativ reagierte, zeigten Nettoextinktionswerte von unter 0,2 an und wurden somit als negativ eingestuft.

Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, daß Bluteluat im Enzygnost-ELISA prinzipiell getestet werden können. Allerdings zeigen sie niedrigere Titer als die korrespondierenden Seren.

Bei blutgetränkten Filterpapierkreisen stellten wir fest, daß eine Elutionszeit von 15 Minuten geringere Titerwerte zur Folge hat als Elutionszeiten von 30, 60, 120 Minuten oder 15 Stunden (über Nacht) hatten, bei denen keine signifikanten Titerunterschiede gemessen wurden.

Zur Feststellung des Einflusses der Elutionszeit auf die Extinktion der puren Flüssigkeit, in welcher nur das Papierblättchen eingeweicht worden war, wurde je ein Papierkreis pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (Fa. Greiner, Nürtingen) mit 0,2 ml Verdünnungspuffer gegeben und nach unterschiedlichen Zeiten (30, 45 und 60 Minuten) und mit und ohne Auspressen des Papierkreises vor der Messung bei 405 nm bestimmt. Der Versuch ergab, daß sich die Extinktion sowohl durch eine längere Einwirkzeit, als auch durch das Auspressen des Papiers erhöht.

Um einerseits die Extinktionswerte nicht durch die Farbe des Papiers wesentlich zu erhöhen und andererseits ein gutes Elutionsergebnis zu erreichen, wurden 88 Blut- und Serumproben mit einer Elutionszeit von 20 Minuten bei 37°C (ohne Auspressen der Papierkreise) geprüft. Es zeigte sich zwar, daß die Sensitivität des ELISAs unter Verwendung von Bluteluatproben geringer ist, die Spezifität des Testes kann aber als vergleichbar bewertet werden. Es wurde deshalb entschieden, bei den Reihenuntersuchungen generell eine Elutionszeit von 20 Minuten bei 37°C (ohne Auspressen der Papierkreise) einzuhalten.

4.2.3. Der Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Antigen-Antikörperbindung

Nach Zugabe von Bluteluaten (Verdünnung 1:88) in die Näpfe (mit und ohne Antigenbeschichtung) der ELISA-Platten wurde der Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeiten (1, 1 1/2 und 2 Stunden bei 37°C) auf die Extinktionswerte überprüft. Parallel liefen gleichartige Tests mit Seren.

Die unterschiedlichen Inkubationszeiten ließen keine signifikant differierenden Extinktionswerte erkennen. Da Seren nach der Vorschrift des "Enzygnost"-Herstellers 1 Stunde bei 37°C inkubiert werden sollten, wurden diese Bedingungen auch bei der Untersuchung der Bluteluate eingehalten.

4.2.4. Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen Verdünnungsstufe der Eluate

Ausgangssuspension war das mit 1,056 ml VP (Behring) über 20 Minuten bei 37°C in Eppendorfgläsern aus zwei ausgestanzten blutgetränkten Filterpapierkreisen erhaltene Eluat. Für die Durchführung des ELISAs wurde es 1:44, 1:88 und 1:176 verdünnt. Zum Vergleich diente die 1:44 verdünnte korrespondierende Serumprobe. Eindeutig stellte sich bei allen Testen dieser Art - es wurden 124 Proben untersucht - heraus, daß die Nettoextinktionen der Blutproben in allen Verdünnungsstufen stets geringer, d.h. niedriger sind als die der Serumproben in der Verdünnung 1:44. Wurden dagegen die Nettoextinktionen von Bluteluaten der Verdünnungen 1:44, 1:88 und 1:176 miteinander verglichen, so zeigte sich, daß diese Werte stets bei der Verdünnung 1:88 am höchsten sind. In Übereinstimmung damit konnte auch festgestellt werden, daß die unspezifischen Reaktionen der 1:44 verdünnten Bluteluate höher waren als die der Verdünnung 1:88 und die der 1:44 verdünnten Serumprobe.

Außerdem hatten die 1:176 verdünnten Blutproben niedrigere Extinktionswerte als die 1:44 verdünnten Serumproben.

Als Konsequenz dieser Vorversuche wurden die Blutproben-Eluate des Untersuchungsmaterials künftig in der Verdünnung 1:88 getestet.

4.2.5. Versuche zur Reduktion unspezifischer Extinktionen bei der Auswertung von Vollblut-Eluaten im ELISA

Die Extraktion der mit Vollblut getränkten ausgestanzten Filterpapierkreise führte zu hohen Extinktionsswerten, unabhängig davon, ob es sich um Blut handelte, das von infizierten oder nicht infizierten Tieren stammte. Dies gab Anlaß, verschiedene Methoden auf ihre Eignung zu untersuchen, unspezifische Reaktionen im ELISA zu reduzieren.

Versuche, durch Zentrifugation der Eluate bei 1500 g (ca. 5 Min.) Bestandteile des Papiers, die eventuell zu unspezifischen Extinktionen führen, zu entfernen, verbesserten die Ergebnisse nicht.

Die vorübergehende Zugabe von Eluaten in die mit Kontrollantigen beschichteten Näpfe über 30 Minuten bei +4°C ließ ebenfalls keine Verbesserung unspezifischer Extinktionswerte erkennen. Sie nahmen vielmehr zu, deshalb wurde diese Vorbehandlung nicht weiter durchgeführt.

Die Annahme, daß spezifische Antikörper bei der Elution der ausgestanzten Blutproben in Eppendorf-Gefäßen (2 ml) an die Wand der Gefäße adsorbiert und so im eigentlichen Test nicht mehr erfaßt würden, gab Anlaß, die Elution von nur 1/2 oder 1 ausgestanzten Kreis mit 200 µl Verdünnungspuffer bei 37°C direkt in den Näpfen der Microtiterplatten über unterschiedliche Zeiten (20 Min bis 1 1/2 Std) durchzuführen. Eine Verbesserung gegenüber der Elution in Eppendorfgefäßen war jedoch nicht feststellbar. Auch eine zusätzliche 30minütige Behandlung der Näpfe mittels einer 4%igen Rinderserumalbuminlösung (BSA) in PBS (pH 7,2) und einer anschließenden gründlichen Spülung mit Waschpuffer (Fa. Behring) vor der Konjugation erbrachte keine besseren Werte, d.h. die BSA-Lösung hatte nicht die erhoffte Wirkung eines "Blockproteins".

4.3. Vorversuche für die Anwendung des Serum-Neutralisations-Testes (SNT) und des Latexagglutinations-Testes (LT) zur Untersuchung von getrockneten Vollblutproben

4.3.1. Vorversuche für die Anwendung des SNTs

Zur Bestimmung des Titters der im SNT verwendeten Virussuspension wurde zuerst der Virus-Teststamm BI 4 austitriert. Die Titration ergab, daß die Virussuspension 1:3500 verdünnt werden mußte, um die zu verwendende Virusdosis von 50 KID 50/25µl einzustellen. Danach erfolgt die Überprüfung der Methode mittels 6 Serumproben, welche im ELISA ein positives, jedoch das Blut der gleichen Tiere ein negatives Ergebnis geliefert hatten. Die Serumproben wurden jeweils unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:8 verwendet und zum Ausschluß eines zytopathischen Effektes in jeder Verdünnungsstufe ein Kontrollserum mit untersucht. Alle 6 Serumproben waren auch im SNT positiv, d.h. es kam in keiner Verdünnung zu einem zpE.

4.3.2. Vorversuche für die Anwendung des LTs

Da die Vorschriften des LTs nur für unverdünnte Serumproben gelten, mußte die Methodik zuerst mit möglichst konzentrierten Blutprobeneluateten ausgetestet werden.

Hierfür wurden von 7 im ELISA positiven und von 3 in diesem Test negativen Blutproben je 4 blutgetränkte Papierkreise in 240µl Verdünnungspuffer (entspricht einem Verhältnis Blutserum zu Puffer wie 1:5) 20 Minuten bei 37°C eluiert und diese und 4 im ELISA positive Seren im LT untersucht. Des weiteren wurden jeweils 2 positive und 2 negative Serumproben im Vergleich mit den entsprechenden Blutproben untersucht. Die Ergebnisse entsprachen sowohl bei den eluierten Blutproben, als auch bei den Serumproben den bereits bekannten (ELISA, SNT) Ergebnissen. Allerdings mußte bei den Blutproben die Reaktionszeit von 4-6 Minuten - wie für die Serumuntersuchung vorgeschrieben - auf 10-13 Minuten ausgedehnt werden, um eine deutliche Agglutination mit bloßem Auge erkennen zu können.

Um festzustellen, ob die Ergebnisse des LTs eher mit denen des

ELISAs oder mit denen des SNTs vergleichbar sind, wurden 2 weitere Proben untersucht, die im ELISA negativ und im SNT bei der entsprechenden Serumprobe (unverdünnt) schwach positiv waren. Die Ergebnisse waren im LT negativ, d.h. der LT zeigte bei der Untersuchung von Vollblut nicht die gleiche Empfindlichkeit wie der Serum-NT.

4.4. Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse

4.4.1. Ergebnisse der Untersuchung von 805 Serum- und 805 korrespondierender Blutproben im Enzygnost-ELISA (Behring)

Insgesamt 805 Serum- und Blutproben, die von Schweinen aus 26 Provinzen Thailands in den Monaten Februar bis April 1988 gesammelt worden waren, wurden im Enzygnost-ELISA (Behring) auf AK-spezifische Antikörper untersucht. Die Mehrzahl der Proben wurde im Einfachansatz untersucht. Nur einige der schwach positiven Proben (ca. 25) mit einer Nettoextinktion von unter 0,4 wurden ein zweites Mal beurteilt. Bei den Serumproben konnten 212 (=26,34%) als positiv, 590 (=73,29%) als negativ beurteilt werden. 3 Proben (0,37%) wurden als fraglich beurteilt, da sie einmal ein negatives und einmal ein schwach positives Ergebnis geliefert hatten. Bei den Blutproben (Eluatausgangsverdünnung 1:88) reagierten 142 (=17,64%) positiv, 661 (=82,11%) negativ und 2 Blutproben (0,25%) zeigten ein fragliches Ergebnis.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Ergebnisse:	positiv (%)	negativ (%)	fraglich (%)	Summe (%)
Serum- proben	212 (26,34)	590 (73,29)	3 (0,37)	805 (100)
Blut- proben	142 (17,64)	661 (82,11)	2 (0,25)	805 (100)

Tabelle 2: Gesamtvergleich: Untersuchung von Blut- und Serumproben mittels ELISA.

Die Auswertung einander korrespondierender Proben, d.h. Serum- und Blutprobe stammten vom selben Tier, läßt folgende Verhältnisse erkennen (siehe Tabelle 3):

Blut- und Serumproben stimmten in 588 Fällen mit negativem und in 140 Fällen mit positivem Befund überein. 70 Serumproben waren

im Test positiv, die dazu gehörenden Blutproben jedoch negativ. Mit Ausnahme von zwei Einzelfällen waren alle negativen Serumproben auch bei der Vollblutuntersuchung negativ.

		positiv	Serumproben negativ	fraglich	Summe
Blut- Proben	positiv	140	2	-	142
	negativ	70	588	3	661
	fraglich	2	-	-	2
Summe		212	590	3	805

Tabelle 3: Vergleich von Blut- und Serumproben gleichen Ursprungs mittels ELISA.

Zusammenfassend läßt sich eine klare Überlegenheit in der Sensitivität des Testes bei der Untersuchung von Serum feststellen, während wesentliche Differenzen in der Spezifität zwischen der Untersuchung von Serum bzw. Blut nicht zutage treten.

4.4.2. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen im SNT und ELISA

Von insgesamt 805 gesammelten und im ELISA getesteten Serumproben wurden 645 Sera zusätzlich im SNT überprüft (Bluteluatproben wurden nicht im SNT untersucht). Diese Proben waren sowohl bei der Serum- als auch bei der Bluteluatuntersuchung im ELISA als negativ oder schwach positiv (mit Extinktionswerten zwischen 0,2 und 0,4) bewertet worden oder sie waren durch unterschiedliche Ergebnisse in der Bluteluat- und Serumuntersuchung als fraglich eingestuft worden.

Tabelle 4 stellt dar, daß hiervon 499 (77,36%) auch im SNT negativ und 146 (22,64%) positiv reagierten.

Ergebnisse:	positiv (%)	negativ (%)	Summe (%)
Serumproben	146 (22,64)	499 (77,36)	645 (100)

Tabelle 4: Ergebnis der Untersuchung von 645 Serumproben im Serumneutralisationstest (SNT).

Tabelle 5 gibt eine Aufschlüsselung der ELISA- und SNT-Ergebnisse des gleichen Untersuchungsmaterials wieder. Von den insgesamt 645 Serumproben hatten im ELISA - wie die dazu gehörigen Blutproben - 566 negativ, 4 schwach positiv und 75 fraglich (zusammen 79) reagiert. Im SNT erwiesen sich von den 566 im ELISA negativen Proben nur 495 als negativ, in 71 Fällen konnte ein positives Ergebnis festgestellt werden. Von den 79 im ELISA schwach positiven bzw. fraglichen Proben wurden im SNT 75 als positiv und 4 als negativ beurteilt.

		Ergebnisse im ELISA (Blut- und Serumproben)		Summe der Proben im SNT
		schwach positiv u. fraglich	negativ	
Ergebnisse	positiv	75	71	146
	negativ	4	495	499
Summe der Proben im ELISA		79	566	645

Tabelle 5: Vergleich der Ergebnisse von im ELISA schwach positiven, fraglichen und negativen Proben mit den Ergebnissen dieser Proben im SNT.

Die im ELISA als negativ, jedoch im SNT als positiv eingestuft 71 Serumproben wurden austitriert (siehe Tabelle 6). Es zeigte sich, daß die Mehrzahl der Seren Titer von höchstens 1:3 hatten, vereinzelt reagierten Seren jedoch noch in höheren Verdünnungen.

Titer im SNT	Anzahl positiver Seren
unverdünnt	55
1 : 2	8
1 : 3	4
1 : 4	1
1 : 6	1
1 : 8	1
> 1 : 16	1
Summe	71

Tabelle 6: Titer und Anzahl der im SNT positiven Seren, welche im ELISA sowohl als Serumproben als auch als korrespondierende Blutproben negativ waren.

Eine detaillierte Übersicht über das Verhalten der Seren im ELISA und im SNT zeigt Tabelle 7. Von den 645 Proben waren im ELISA und im SNT 496 negativ und 73 positiv. Es zeigten sich jedoch auch 72 Proben, welche im ELISA negativ und im SNT positiv beurteilt werden mußten. Nur eine im ELISA positive Probe wurde im SNT als negativ bewertet. In 3 Fällen, d.h. in weniger als 0,5% aller Proben, waren die im ELISA erzielten Ergebnisse als fraglich zu beurteilen, im SNT konnten jedoch hierzu Aussagen gemacht werden (2 x negativ, 1 x positiv).

		ELISA Serumproben			Summe
		positiv	negativ	fraglich	
SNT	positiv	73	72	1	146
	negativ	1	496	2	499
Summe		74	568	3	645

Tabelle 7: Vergleich der Ergebnisse der Serumuntersuchungen im SNT und im ELISA.

In Tabelle 8 sind die Resultate eines Vergleichs einander gegenübergestellt, der sich aus den Ergebnissen korrespondierender Bluteluatuntersuchungen im ELISA und Serumprobenuntersuchungen im SNT ergibt. Es wurden 645 Blut- und Serumproben miteinander verglichen. Von den Bluteluaten reagierten im ELISA 6 positiv, 637 negativ und 2 mit fraglichem Ergebnis. Die korrespondierenden Seren waren dagegen 146 Mal positiv und 499 Mal negativ (im SNT). In 497 Fällen wurde in beiden Testen ein negatives Ergebnis, in nur 4 Fällen ein gemeinsames positives Ergebnis gefunden. 140 Proben (Bluteluat) waren im ELISA (Bluteluat) negativ, deren korrespondierende Serumproben zeigten im SNT ein positives Ergebnis.

		ELISA Blutproben			Summe
		positiv	negativ	fraglich	
SNT	positiv	4	140	2	146
	negativ	2	497	-	499
Summe		6	637	2	645

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse von Blutproben im ELISA mit den korrespondierenden Serumproben im SNT.

Aus den Tabellen 4 - 8 ist zu ersehen, daß die Sensitivität des SNT im Vergleich zum ELISA (Serum- und Bluteluatproben) eindeutig höher ist. Das wird vor allem dadurch deutlich, daß im ELISA negativ reagierende Proben im SNT positiv reagieren, wenn auch die Serumproben nur unverdünnt oder in sehr niedrigen Verdünnungen untersucht wurden.

4.4.3. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen im LT (Iffa Merieux), SNT und ELISA

In weiteren Untersuchungen wurde die Sensitivität des Latex-Testes (LT) mit der des ELISAs und des SNTs anhand von 189 ausgewählten Proben - 61 Sera und 128 Blutprobeneluat - verglichen.

Im ELISA waren 43 Bluteluat- bzw. Serumproben positiv, 16 sowohl im ELISA als auch im SNT negativ und 130 fraglich eingestuft worden (siehe Tabelle 9). Bei den Serumproben reagierten im LT 10 positiv, 49 negativ und 2 mit fraglichem Ergebnis. Bei den Blutproben wurden 56 als positiv und 72 als negativ bewertet. Es bestand folglich Übereinstimmung in den Ergebnissen des LTs bei der Beurteilung der im ELISA und im SNT negativ bzw. der im ELISA positiv beurteilten Proben. Einzelheiten zur Bewertung der im ELISA und im SNT als fraglich eingestuften Proben und deren Ergebnis im LT sind in Tabelle 9 zu ersehen.

			positiv im ELISA *	negativ im ELISA u. im SNT **	fraglich ***	Summe (%)
LT	61 Serum- proben (100%)	positiv	6	-	4	10 (16.39)
		negativ	-	2	47	49 (80.33)
		fraglich	-	-	2	2 (3.28)
	128 Blut- proben (100%)	positiv	37	-	19	56 (43.75)
		negativ	-	14	58	72 (56.25)
Summe			43	16	130	189

Tabelle 9: Vergleich der Ergebnisse von 61 Serumproben und 128 Blutproben im LT mit den Ergebnisse dieser Proben im ELISA und z.T. im SNT.

- * Positives Ergebnis sowohl bei der Serum- als auch bei der Blutuntersuchung im ELISA.
- ** Negatives Ergebnis sowohl im ELISA (Blut- und Serumproben) als auch im SNT.
- *** Ein Ergebnis der 3 Untersuchungen (SNT, ELISA/Blut und ELISA/Serum) weicht von den beiden anderen ab.

In den Tabellen 10 und 11 werden die Ergebnisse von Serumproben im LT mit den Ergebnisse von Serum- bzw Blutproben im ELISA verglichen. Auch wenn nur 10 im LT positive Serumproben zur Verfügung standen, zeigte sich dadurch die Tendenz, daß der LT eine höhere Sensitivität besitzt als der ELISA, da bei diesem nur 6 Proben als positiv erkannt wurden. Einzelheiten über die negativen und fraglichen Ergebnisse sind den Tabellen zu entnehmen.

			ELISA Serumproben positiv negativ		Summe
LT	Serum- proben	positiv	6	4	10
		negativ	-	49	49
		fraglich	-	2	2
Summe			6	55	61

Tabelle 10: Vergleich der Ergebnisse der Serumuntersuchungen im LT und im ELISA.

			ELISA Blutproben		Summe
			positiv	negativ	
LT	Serum- proben	positiv	6	4	10
		negativ	1	48	49
		fraglich	-	2	2
Summe			7	54	61

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse von Blutproben im ELISA mit den korrespondierenden Serumproben im LT.

Ein Vergleich der Ergebnisse von im LT untersuchten Bluteluaten mit im ELISA getesteten zugehörigen Serumproben (Tabelle 12) läßt eindeutig die Überlegenheit letzterer Methode erkennen. 128 Serumproben wurden ausgewertet: 53 Serumproben reagierten positiv, obwohl deren korrespondierende Bluteluete im LT als negativ beurteilt worden waren. Der Vergleich von gleichen Bluteluaten im ELISA und im LT bestätigt eindeutig die Überlegenheit des LTs (siehe Tabelle 13): Während nur 2 Bluteluete im LT negativ und im ELISA jedoch positiv waren, waren 16 im ELISA negative Eluate im LT positiv.

			ELISA Serumproben			Summe
			positiv	negativ	fraglich	
LT	Blut-	positiv	55	1	-	56
	proben	negativ	53	18	1	72
Summe			108	19	1	128

Tabelle 12: Vergleich der Ergebnisse von Serumproben im ELISA mit den korrespondierenden Blutproben im LT.

			ELISA Blutproben			Summe
			positiv	negativ	fraglich	
LT	Blut-	positiv	38	16	2	56
	proben	negativ	2	70	-	72
Summe			40	86	2	128

Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse der Blutuntersuchungen im ELISA und im LT.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Untersuchung von 89 Serumproben im SNT und 89 zugehöriger Bluteluatate, die mittels LT überprüft wurden, einander gegenübergestellt. Mit den Ergebnissen kann auf eine wesentlich höhere Sensitivität des SNTs geschlossen werden: Bei den Serumproben wurden 73, bei den Bluteluatproben nur 18 als positiv beurteilt.

			SNT		Summe
			positiv	negativ	
LT	Blut-	positiv	18	-	18
	proben	negativ	55	16	71
Summe			73	16	89

Tabelle 14: Vergleich der Ergebnisse von Blutproben im LT mit den korrespondierenden Serumproben im SNT.

Die Tabelle 15 vergleicht dagegen die Ergebnisse der Untersuchung von Serumproben im LT mit denen im SNT. Hierbei wurden insgesamt 55 Serumproben getestet. Im SNT reagierten davon 52 positiv und 3 negativ, von den im SNT positiven Proben konnten im LT nur 4 als positiv und 46 als negativ beurteilt werden. 2 Proben zeigten im LT keine eindeutige Agglutination und wurden somit als fraglich bewertet. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die in Tabelle 14 gemachte Aussage, wonach dem SNT eine wesentlich höhere Sensitivität zuzuschreiben ist, als dem LT. Dies wird insbesondere dadurch unterstrichen, daß bei keiner im SNT negativen Probe ein positives Ergebnis im LT gefunden werden konnte.

			SNT		Summe
			positiv	negativ	
LT	Serum- proben	positiv	4	-	4
		negativ	46	3	49
		fraglich	2	-	2
Summe			52	3	55

Tabelle 15: Vergleich der Ergebnisse der Serumuntersuchungen im SNT und im LT.

4.4.4. Zusammenfassender Vergleich der Untersuchungsmethoden

Die bei der Untersuchung von mehr als 800 Serumproben und Bluteluaten mittels ELISA ("Enzygnost", Fa. Behring), Latex-Test (Fa. Iffa Merieux) und Serum-Neutralisation gewonnenen Ergebnisse lassen eindeutig folgende Beurteilung über die Sensitivität der Tests zu:

Am empfindlichsten ist der SNT. Bei der Untersuchung von Seren werden im LT und im ELISA weniger positive Fälle nachgewiesen, allerdings mehr als bei der Untersuchung von Bluteluaten im Latex-Test. Bei der Untersuchung von Bluteluaten im ELISA wird eine geringere Anzahl von positiven Proben als im ELISA und LT unter Verwendung von Seren erkannt. Außerdem ist bei der Bluteluatuntersuchung der LT dem ELISA eindeutig überlegen, und auch bei Serumuntersuchungen scheint der LT empfindlicher zu sein.

Zusammengefaßt ergibt sich folgendes Bild:

Serum-NT > LT (Serum) > ELISA (Serum) > LT (Blut) > ELISA (Blut)

4.4.5. Die Ergebnisse der Serum- bzw. Bluteluatuntersuchungen in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere

Die Ergebnisse der im ELISA untersuchten 802 Serumproben - die 3 fraglichen Ergebnisse sind nicht mit dargestellt - wurden verschiedenen Altersgruppen der Spendertiere (23 Tiere unter einem Monat, 114 im Alter von 1-3 Monaten, 237 im Alter von 3-8 Monaten und 428 über 8 Monate alte Schweine) zugeordnet. Hiervon waren 3 bzw. 31 bzw. 46 bzw. 132 AK-positiv (Tabelle 16). Unter Berücksichtigung der Zahlen dieser Tabelle konnte ein "Chi-Quadrat" (χ^2) von 16,04 errechnet werden und somit kann man von einer signifikanten Abhängigkeit (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$) zwischen dem Alter und den Ergebnissen der Serumuntersuchungen sprechen, d.h. je älter die Tiere sind, desto häufiger werden Antikörper gegen die AK nachgewiesen.

Eine prinzipiell ähnliche Aussage über die Signifikanz kann auch aus den Tabellen 17 ($\chi^2=8,03$; $p < 0,05$), 18 ($\chi^2=12,9$; $p < 0,01$) und

20 ($X^2=11,52$; $p<0,01$) gezogen werden (Einzelheiten siehe Tabellen). Nur nach den Ergebnissen in Tabelle 19 kann keine signifikante Abhängigkeit zwischen Alter und dem Nachweis von Antikörpern festgestellt werden. Bei zwei Freiheitsgraden liegt der ermittelte X^2 -Wert unter dem Tabellenwert von 5,99 (bei $p < 0,05$).

Zu den letztgenannten Tabellen ist noch folgendes anzumerken: Wie bereits beschrieben, handelt es sich nur bei der Untersuchung im ELISA um zufällig ausgesuchte Proben, die Untersuchungen im SNT und im LT wurden mit bestimmten ausgewählten Serum- und Blut-eluatproben durchgeführt.

Außerdem sind in den Tabellen 19 und 20 wegen der geringen Untersuchungszahlen die beiden jüngeren Altersstufen zusammen dargestellt. In den Tabellen 17 und 19 sind die fraglichen Ergebnisse dieser Untersuchungsmethoden nicht dargestellt.

Alter der Schweine (Monate)	ELISA Serumproben		Summe
	positiv	negativ	
unter 1	3	20	23
1-3	31	83	114
3-8	46	191	237
über 8	132	296	428
Summe	212	590	802

$$(X^2 = 16,04; p < 0.01)$$

Tabelle 16: Ergebnisse der Untersuchung von Serumproben im ELISA in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere.

Alter der Schweine (Monate)	ELISA Blutproben		Summe
	positiv	negativ	
unter 1	1	22	23
1-3	13	102	115
3-8	35	202	237
über 8	93	335	428
Summe	142	661	803

$$(X^2 = 8,03; p < 0.05)$$

Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung von Blutproben im ELISA in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere.

Alter der Schweine (Monate)	SNT		Summe
	positiv	negativ	
unter 1	3	19	22
1-3	35	68	103
3-8	33	157	190
über 8	75	255	330
Summe	146	499	645

$$(X^2 = 12,9; p < 0.01)$$

Tabelle 18: Ergebnisse der Untersuchung von Serumproben im SNT in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere.

Alter der Schweine (Monate)	LT Serumproben		Summe
	positiv	negativ	
0-3	3	10	13
3-8	4	16	20
über 8	3	23	26
Summe	10	49	59

$$(X^2 = 0,59)$$

Tabelle 19: Ergebnisse der Untersuchung von Serumproben im LT in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere.

Alter der Schweine (Monate)	LT Blutproben		Summe
	positiv	negativ	
0-3	3	21	24
3-8	16	20	36
über 8	37	31	68
Summe	56	72	128

$$(X^2 = 11,52; p < 0.01)$$

Tabelle 20: Ergebnisse der Untersuchung von Blutproben im LT in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere.

5. Diskussion

Die Bekämpfung der Aujeszky'schen Krankheit (AK) ist in allen endemisch verseuchten Ländern ein für die betreffenden Tierbesitzer und für die Veterinärverwaltungen schwieriges Problem. Seiner zwingend notwendigen Lösung - die Schäden für die Schweineproduktion sind weltweit enorm - stehen viele Faktoren entgegen. Veterinärpolizeiliche Überlegungen und Verordnungen kollidieren mit Handelsrestriktionen und die pathogenetischen Besonderheiten der AK (Viruslatenz, Altersabhängigkeit der Krankheitsformen etc.) erschweren nicht nur die Diagnose der Erkrankung, sondern auch ihre Bekämpfung und letztlich das Verständnis für entsprechende Maßnahmen bei den Schweinebesitzern.

In Thailand ist die Bekämpfung der AK nicht gesetzlich geregelt wie in der Bundesrepublik Deutschland. Wirtschaftlich unabhängige, d.h. finanziell dazu fähige Farmer - meist Großbetriebe, können sich entsprechende tierärztliche Beratungen und die Impfung ihrer Tiere - meist der Zuchttiere - leisten. Die Mehrzahl der ärmeren Kleinbauern, die das Gros der ländlichen Bevölkerung darstellen und die sich in und um das Haus nur wenige Tiere halten können, kann von den zu bezahlenden Möglichkeiten einer prophylaktischen Seuchenbekämpfung kaum Gebrauch machen. Die Tierhalter erfahren wohl auch nur selten, ob ihre gekauften Tiere geimpft wurden. Trotz dieser für manch anderes Land in Südostasien ebenfalls zutreffenden Verhältnisse bemüht sich die thailändische Veterinärverwaltung und das DLD die AK, soweit es technisch möglich ist, zu bekämpfen. Hinweise für ihr Vorkommen gibt es seit 1977/78. Dies geht insbesondere aus den Untersuchungen von Sunyasootcharee et al. (1978, 1980, 1981, 1982 und 1983) hervor. Seither sind keine größeren epizootiologischen Erhebungen mehr vorgenommen worden.

In Absprache mit dem DLD sollte im Rahmen dieser Arbeit ein ausgedehnter Survey die Verbreitung der AK in Thailand feststellen. Aus wissenschaftlicher Sicht war es hierbei interessant zu prüfen, ob sich der für die Untersuchung von Serumproben in die Routinediagnostik international eingeführte ELISA auch für die

Prüfung von Vollblutproben eignet. Dies hätte den Vorteil, daß in entlegenen Gebieten unter widrigen Umwelt- und Hygienebedingungen eine große Anzahl von Proben genommen werden könnte, insbesondere dann, wenn auf Filterpapier angetrocknetes Blut nach seiner späteren Elution ausgewertet werden könnte. Der Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der AK sollte mit den kommerziell erhältlichen Testkits der Firma Behring (Marburg, Bundesrepublik Deutschland) "AK-Enzygnost" durchgeführt werden, wobei, um entsprechende Aussagen über die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei der Untersuchung von Bluteluaten bzw. Serum zu treffen, beide Proben jeweils vom selben Tier stammen sollten.

In Vorversuchen wurde geklärt, welches Filterpapier prinzipiell geeignet ist, um in Diapositiv-Kassetten gestellt zu werden, damit die Proben vor Fliegen und Staub geschützt getrocknet werden können. Von drei verschiedenen Sorten erwies sich das Papier der Firma Dynatech als für diesen Zweck geeignet. Dann wurde ermittelt, welche Blutmenge in einem ausgestanzten Kreis mit einem Durchmesser von ca. 5,5 mm enthalten ist, um eine Relation zwischen der Blutmenge und dem Serum zu finden.

Weitere Vorversuche sollten die prinzipielle Eignung des Enzygnost-ELISA für die Auswertung von Trockenblutproben feststellen. Folgende Parameter wurden auf ihren Einfluß auf den Ablauf der ELISA-Reaktion dabei einzeln und in Kombination unter z.T. wechselnden Versuchsbedingungen überprüft: Die Art der Pufferlösung, die Elutions- und Inkubationszeit und die optimale Verdünnungsstufe der Bluteluat. Spezielle Tests waren der Reduktion unspezifischer Extinktionen bei der Auswertung von Bluteluaten im ELISA gewidmet. Die Auswertung dieser Vorversuche führte dazu, daß die Vollblut-Eluate im Enzygnost-Test nach der folgenden modifizierten Technik untersucht wurden: Mit 1056 µl Pufferlösung der Firma Behring wurden 2 ausgestanzte Kreise des blutgetränkten Microdiluter Delivery-Tester (MDT)-Papiers, die umgerechnet zusammen 0,04 ml (vor der Trocknung) Vollblut enthielten, über 20 Minuten bei 37°C ohne Auspressen eluiert. Durch die anschließende Verdünnung im ELISA ergab sich daraus unter Be-

rücksichtigung des Hämatokritwertes eine Serumverdünnung von 1:88. Die Inkubation dieser Eluate in Mikrotiterplatten erfolgte - wie üblich - über 1 Stunde bei 37°C. Alle übrigen Arbeitsschritte waren mit den Angaben des Herstellers für die Untersuchung von Serumproben identisch.

Der Serum-Neutralisations-Test (SNT) wurde nach der am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen in Oberschleißheim praktizierten Technik durchgeführt, wobei ein Serum dann als negativ bezeichnet wurde, wenn es unverdünnt einen zpE nicht verhinderte.

Der Latex-Agglutinations-Test (Fa. Iffa Merieux, Laupheim) mußte für die Untersuchung von Bluteluaten insofern modifiziert werden, als die Reaktionszeit auf 10-13 Minuten erhöht werden mußte, um sichtbare Agglutinationen zu erzielen. Die Untersuchung der Serumproben erfolgte nach Angaben des Test-Kit-Herstellers.

Insgesamt wurden 805 Serum- und Blutproben, die von Schweinen aus 26 Provinzen Thailands in den Monaten Februar bis April 1988 gesammelt worden waren, im Enzygnost-ELISA (Behring) auf AK-spezifische Antikörper untersucht. Von den insgesamt 86 untersuchten Beständen standen in 43 Schweinefarmen Tiere mit positivem AK-Antikörper-Befund, wobei zu bemerken ist, daß es sich hierbei auch um Befunde von geimpften Schweinen handelte. Insgesamt erwiesen sich 26% der Serumproben bzw. 18% der Blutproben als positiv. Dies läßt eine klare Überlegenheit in der Sensitivität des Testes bei der Untersuchung von Serum erkennen. Wesentliche Differenzen, die die Spezifität der Ergebnisse der Untersuchung von Serum bzw. Bluteluaten betreffen, konnten dagegen nicht festgestellt werden. Vergleicht man die hier mitgeteilten Ergebnisse mit denen anderer Autoren, so ergeben sich allerdings einige Unterschiede:

Beim Vergleich von Serum- und Bluteluatproben im ELISA hatte Banks (1985) zwar bei der Bluteluatuntersuchung auch höhere unspezifische Extinktionswerte als bei der Serumuntersuchung festgestellt, er kam aber trotzdem auf eine 100%ige Korrelation. Ebenso stellten Oliver et al. (1987) eine 100%ige Übereinstimmung

beim Vergleich der beiden Methoden im ELISA fest. Toma et al. (1986) und Eloit et al. (1987) kamen bei der Bluteluatuntersuchung im Vergleich zur Serumuntersuchung auf eine Spezifität von 100% und auf eine Sensitivität von 90 bzw. 98%. Im Gegensatz dazu war die Übereinstimmung unserer Ergebnisse der Bluteluat-Untersuchungen geringer: Die Spezifität lag zwar bei 99,7%, aber wir konnten nur eine Sensitivität von 66% errechnen. Ein Grund hierfür könnte die Verwendung einer anderen Papiersorte sein. Die oben genannten Autoren haben alle das Papier Whatman-Nr.1 verwendet. In unseren Untersuchungen war dieses Papier bereits in Vorversuchen ausgeschieden, da es durch seine mangelhafte Stabilität in den von uns verwendeten Diapositiv-Kästen kleben blieb. Die Verwendung dieser Kästen war unter Praxisbedingungen notwendig, um eine einfache und schnelle Probengewinnung unter Bewahrung eines Mindestmaßes an Hygiene zu gewährleisten.

Die von uns festgestellte geringe Sensitivität hatte die Vorstellung, daß das Sammeln von Blutproben auf dem von uns verwendeten Filterpapier (MDT-Papier, Dynatech) eine für den Einsatz in der Routinediagnostik empfehlenswerte Methode sein könnte, nicht erfüllt. Der Grund hierfür war vor allem darin zu suchen, daß in erster Linie stark positive Seren zugleich auch positive Reaktionen der Bluteluat bewirkten. Seren, die im ELISA mit zwar noch einwandfreien, aber im unteren Bereich liegenden Nettoextinktionen reagierten, ließen dagegen bei der Überprüfung der Bluteluat häufig keine positiven Reaktionen mehr erkennen. Für die Praxis bedeutet dies, daß die Untersuchung von Bluteluaten nur im Rahmen von größeren Bestandsuntersuchungen eingesetzt werden sollte. Die Zuverlässigkeit dieser Methode gegenüber der Untersuchung von Serum mittels ELISA ist zu gering, um bei der Beurteilung von kleineren Beständen ein sicheres Urteil abgeben zu können.

Interessant sind in diesem Zusammenhang aber auch die Vergleichswerte, die mittels der Auswertung von 645 Seren im SNT erhalten wurden.

566 dieser Seren waren im ELISA als eindeutig negativ und 79

fraglich bzw. schwach positiv eingestuft worden. Im SNT reagierten nunmehr davon 146, das entspricht 22,64%, positiv. Sieht man von den technischen Schwierigkeiten bzw. Nachteilen ab, die mit dem SNT verbunden sind, so demonstriert dieser Test doch eindeutig eine große Überlegenheit in der Sensitivität gegenüber dem ELISA. 71 der im SNT positiv beurteilten Seren wurden austitriert. Hierbei konnten Titer bis zu 1:16 ermittelt werden, die Mehrzahl der Seren hatte jedoch Titer von höchstens 1:3. Darüberhinaus zeigte sich, daß im SNT eindeutige Aussagen gemacht werden konnten, ob ein Serum als positiv oder negativ beurteilt werden muß. Fragliche Reaktionen wie beim ELISA können hier in diesem Test also vermieden werden. Eine noch deutlichere Überlegenheit in der Sensitivität des SNTs tritt bei der vergleichenden Testung von Seren im SNT und Bluteluaten im ELISA auf. Diese Aussage war zu erwarten, weil schon im ELISA große Unterschiede zwischen der Auswertung von Serum und Bluteluaten deutlich geworden waren.

Von wissenschaftlichem Interesse sind auch die Vergleichsuntersuchungen zur Sensitivität des eingesetzten Latexagglutinations-Testes mit der des ELISAs und des SNTs. 189 ausgewählte Proben, nämlich 61 Sera und 128 Blutprobeneluatate wurden verglichen. Es wird gezeigt, daß es eine große Übereinstimmung in den Ergebnissen des LTs mit der Beurteilung der im ELISA und im SNT positiv bzw. negativ beurteilten Proben gibt. Außerdem läßt sich die Tendenz ableiten, daß der LT mit Seren empfindlicher reagiert als der ELISA bei Seren und den korrespondierenden Bluteluaten. Vergleicht man die Ergebnisse von LT-Untersuchungen von Bluteluaten mit im ELISA getesteten zugehörigen Serumproben, so wird eine eindeutige Überlegenheit der letzteren Methode erkennbar. Auch die Ergebnisse der Untersuchung von identischen Bluteluaten im ELISA und im LT bestätigen wiederum eine Überlegenheit des LTs.

Desweiteren wurden die Ergebnisse von 89 Serumproben im SNT mit denen der 89 korrespondierenden Blutproben im LT verglichen. Auch durch diesen Vergleich kann wiederum auf eine wesentlich

höhere Sensitivität des SNTs geschlossen werden. Auch wenn Seren im SNT und im LT miteinander verglichen wurden trat eine Überlegenheit des SNTs hervor.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Wilson und Schipper (1983) überein. Die Autoren kamen auch zu dem Ergebnis, daß der SNT die sensitivere Methode ist, sie favorisierten aber trotzdem den LT, da dieser in seiner Durchführung wesentlich einfacher und schneller zu handhaben ist.

Ein zusammenfassender Vergleich der angewandten Untersuchungsmethoden läßt folgende Reihenfolge in der Sensitivität erkennen. Am empfindlichsten ist der SNT. Bei der Untersuchung von Seren werden im LT und im ELISA weniger positive Fälle nachgewiesen, allerdings mehr als bei der Untersuchung von Bluteluaten im Latextest. Bei der Untersuchung dieser Proben im ELISA wird die geringste Anzahl von positiven Proben erkannt und auch deutlich weniger als im ELISA und LT unter Verwendung von Serum.

Auf Grund unserer Ergebnisse beurteilten wir einen Bestand dann als positiv, wenn folgende Voraussetzungen gegeben waren:

- mindest. eine Serumprobe im ELISA positiv
- und/oder eine Serumprobe im SNT positiv (ab Titer 1:2)
- und/oder eine Serumprobe im LT positiv
- und/oder eine Bluteluatprobe im LT positiv.

Eine negative Bestandsbeurteilung erfolgte unter folgenden Voraussetzungen:

- alle Proben in jedem Test negativ
- und/oder Proben in einem Test fraglich
- und/oder nur eine unverdünnte Serumprobe im SNT positiv
- und/oder nur eine Bluteluatprobe im ELISA positiv.

Eine Probe bzw. ein Tier wurde unter folgenden Voraussetzungen als positiv beurteilt:

- Serumprobe im ELISA positiv
- und/oder Serumprobe im SNT positiv (ab Titer 1:2)
- und/oder Serumprobe im LT positiv
- und/oder Blutprobe im LT positiv.

Die negative Beurteilung einer Probe erfolgte unter folgenden Kriterien:

- alle Teste negativ
- oder ein Test - sowohl in negativen als auch in positiven Beständen - fraglich
- oder eine unverdünnte Serumprobe im SNT - nur bei negativen Beständen - positiv.

Als fraglich wurden Tiere dann beurteilt, wenn nur die unverdünnte Serumprobe im SNT positiv war und das Tier in einem positivem Bestand stand.

Unter diesen Gesichtspunkten waren 43 der 86 Bestände, in denen Proben entnommen wurden, als positiv zu bezeichnen. Epidemiologische Schlüsse darauf, ob eine Provinz frei von AK-positiven Tieren ist, können jedoch nicht gemacht werden, weil die entsprechende Anzahl der Proben zu gering ist. Neben der Anzahl der Proben gibt es noch weitere Faktoren, die vor einer tendenziellen Auswertung diskutiert bzw. berücksichtigt werden müßten. So ist das Alter der Tiere, von denen die Proben genommen wurden, von besonderer Bedeutung. Eine Aufschlüsselung der Proben nach dem Alter der Spendertiere läßt in 4 von 5 Untersuchungsmethoden eindeutig eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Alter und der Häufigkeit von AK-positiven Proben feststellen. So weisen die Gruppen der älteren Tiere zumeist die höhere Anzahl von Antikörper-positiven Seren auf als die jüngerer Tiere. Die geringste Anzahl positiver Proben war bei den unter 1 Monat alten Tieren nachweisbar. Diese Feststellung konnte aus den Untersuchungen von Serumproben und den korrespondierenden Bluteluaten im ELISA übereinstimmend gezogen werden.

Nun ist wiederum von Bedeutung, inwieweit bei den untersuchten Tieren mit dem Vorhandensein von Antikörpern im Serum bzw. im Blut aufgrund einer passiven Immunität oder infolge einer aktiven Immunisierung mit inaktivierten oder Lebend-Impfstoffen zu rechnen ist. Bei der Abnahme der Blutproben wurde versucht, von den Farmern entsprechende Angaben zu erhalten. In einigen

Fällen konnten die Schweinehalter sichere Angaben darüber machen, ob ihre Tiere geimpft waren oder ob ein Ausbruch der AK bereits diagnostiziert war: in der Mehrzahl der Fälle waren jedoch Angaben über Impfungen oder Vorerkrankungen nicht zu bekommen. Nach den allgemeinen Erfahrungen, die in den Beständen gewonnen wurden, aus denen die Blutproben stammten, darf man annehmen, daß die wenigsten der untersuchten Tiere immunisiert worden waren. Bei den unter einem Monat alten positiven Reagenten ist es jedoch wahrscheinlich oder denkbar, daß passiv erworbene Antikörper nachgewiesen wurden. Nach den Untersuchungen von Wittmann (1986) darf man annehmen, daß diese vom Muttertier über das Kolostrum übertragenen Antikörper mindestens 5 Wochen lang persistieren. Wie schon oben erwähnt, war es nicht möglich, Näheres zu erfahren, welche Impfstoffe überhaupt zur Anwendung kamen. Hier könnten erst dann Rückschlüsse gezogen werden, wenn zukünftig nur noch solche Impfstoffe zum Einsatz kommen, die eine Antikörperantwort bewirken, aus der man auf eine Immunisierung schließen kann. Eine Möglichkeit hierfür ist die Anwendung der von van Oirschot et al. (1986, 1988) beschriebenen Impfstoffe, die - im Gegensatz zu Infektionen mit einem Wildtyp-Virus - keine Antikörper gegen ein bestimmtes Glykoprotein (gI) induzieren können. Bei den bisher in Thailand eingesetzten Impfstoffen ist eine Differenzierung zwischen Infektion und Impfung durch Antikörperbestimmung nicht möglich.

Antikörper, die als Antwort auf eine aktive Immunisierung bzw. auf Revakzinationen mit inaktivierten oder Lebend-Impfstoffen entstehen, bleiben zwar i.d.R. über Monate bestehen. Wir glauben jedoch aus der großen Anzahl der gefundenen Reagenten doch den Schluß ziehen zu können, daß derartig breit angelegte Impfungen nicht durchgeführt wurden und daß deshalb von einer weiten Verbreitung der AK in Thailand auszugehen ist.

6. Zusammenfassung

Nach einem Überblick über Thailand und seine landwirtschaftlich-tierärztlichen Strukturen werden die Ergebnisse der Untersuchungen auf Antikörper gegen das Virus der Aujeszky'schen Krankheit (AK) von 805 Serum- und Bluteluatproben von Schweinen aus 86 Betrieben, die in 26 der 73 Provinzen Thailands liegen, mittels eines "Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays" (ELISA, "Enzygnost") der Firma Behring, Marburg, eines Serum-Neutralisations-Testes (SNT) und eines Latexagglutinations-Testes (LT, "Aujeszky-Latex-Kit") der Firma Iffa Merieux, Laupheim, mitgeteilt. Hierbei sollte geklärt werden, ob Eluate von mit Vollblut getränkten Filterpapieren im ELISA genau so gute Ergebnisse liefern wie ihre korrespondierenden Seren.

Im einzelnen wurden folgende Befunde erhoben:

Von den insgesamt 805 Proben zeigten 26% der Serumproben und 18% der Bluteluatproben im ELISA ein positives Ergebnis, d.h. die Untersuchung von Bluteluaten im ELISA ist der Untersuchung von Seren unterlegen und kann deshalb nur bedingt empfohlen werden.

Desweiteren sollten 645 ausgewählte Seren zusätzlich im SNT getestet werden. Es handelte sich bei ihnen um Serumproben, die im ELISA negativ, fraglich oder schwach positiv beurteilt wurden. Im SNT zeigten 23% ein positives Ergebnis.

Außerdem wurden einige Serum- und Bluteluatproben - sie waren zum größten Teil ausgewählt worden, weil ihre Ergebnisse im ELISA und SNT voneinander abwichen und somit als fraglich eingestuft worden waren - zusätzlich mit dem LT untersucht.

Insgesamt kann folgendes Stufenschema der Sensitivität konstatiert werden:

SNT > LT (Serum) > ELISA (Serum) > LT (Blut) > ELISA (Blut)

Außerdem konnte festgestellt werden, daß die Ergebnisse der Untersuchungen in Abhängigkeit zum Alter der Spendertiere stehen, d.h. je älter die Tiere sind, desto häufiger werden Antikörper gegen die AK nachgewiesen.

Aus der gesamten Häufigkeit der Antikörperbefunde, die nach entsprechenden Befragungen der Tierhalter nur zu einem geringerem Teil durch Impfungen provoziert sein können, wird auf eine hohe Durchseuchungsrate der Schweinepopulation Thailands mit dem Virus der AK geschlossen.

Summary

Epizootiological investigations on detection of antibodies against Aujeszky disease virus in sera and eluates of whole blood of thai pigs with ELISA ("Enzygnost", Behring), Serum-Neutralization-Test (SNT) and "Aujeszky-Latex-Kit (Iffa Merieux).

After a comprehensive survey of Thailand and the structure of its agricultural sciences and veterinary medicine, the results of three tests for Aujeszky's disease were analysed and compared. The presence of Aujeszky's antibodies was determined by "Enzyme-linked Immunosorbent Assays" (ELISA, "Enzygnost"), Behring company, Marburg; "Serum neutralization test" (SNT); and "Latex agglutination test" (LT, "Aujeszky-Latex-Kit"), Iffa Merieux company, Laupheim. Whole blood and sera samples were taken from 805 swine from 26 of Thailand's 73 provinces. These samples were analysed to determine if eluates of whole blood on filter paper were as effective as corresponding sera samples in determining the presence of Aujeszky's disease antibodies.

Following are the specific results of the study:
From a total of 805 samples, 26% of the serum and 18% of the blood eluate samples showed a positive result when tested by the ELISA method. Clearly, testing whole blood eluates provides results which are inferior to results from sera samples. Therefore the ELISA whole blood eluates test can only be recommended with reservations.

Further testing was done on 645 serum samples using SNT. Samples tested were those which gave negative, suspicious, or weakly positive results when tested by ELISA. Using SNT, 23% of these showed a positive result.

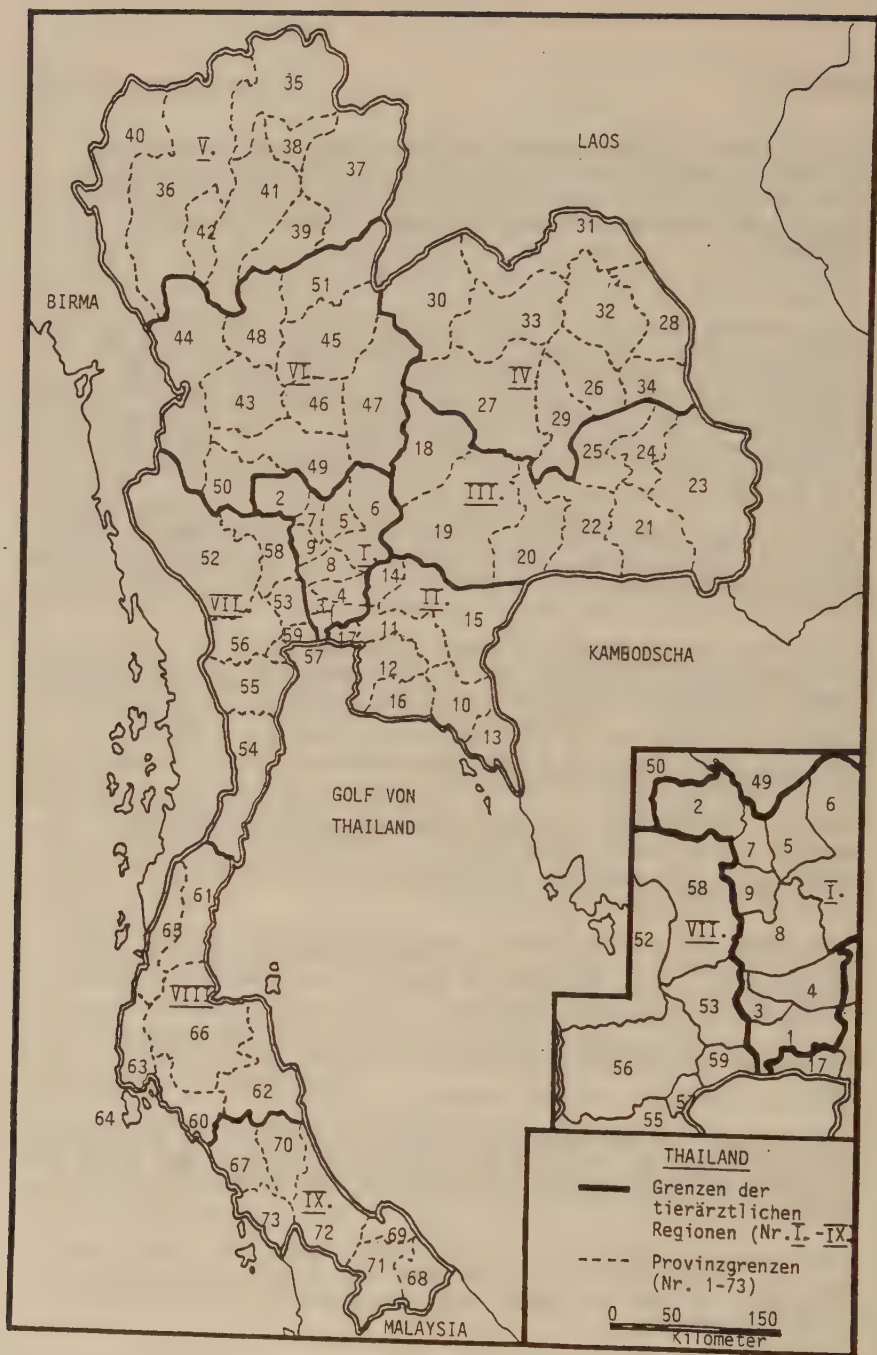
Many serum and blood eluate samples were also tested by LT. Most of these test samples were chosen because they were deemed suspicious. Suspicious samples were defined as those which had deviant test results.

The following sensitivity scheme has been established:

SNT > LT (serum) > ELISA (serum) > LT (blood) > ELISA (blood)

Furthermore, it was determined that the results of the tests were dependent on the age of the subject animal. The older the animal, the increased likelihood that the antibodies would be found.

Owner survey responses tended to state that few animals had been vaccinated. This coupled with the frequency of antibody occurrence proves the high rate of infection among Thailand's swine population.



Karte 1: Die 9 tierärztlichen Regionen und die Provinzen (vgl. nächste Seite)

Die tiermedizinischen Regionen und die Provinzen Thailands

- 1 . Region
 - 1) Bangkok
 - 2) Chainat
 - 3) Nonthaburi
 - 4) Pathumthani
 - 5) Lopburi
 - 6) Saraburi
 - 7) Singburi
 - 8) Ayutthaya
 - 9) Angthong
- 2 . Region
 - 10) Chanthaburi
 - 11) Chacherngsao
 - 12) Chonburi
 - 13) Trat
 - 14) Nakhonnayok
 - 15) Prachinburi
 - 16) Rayong
 - 17) Samutprakan
- 3 . Region
 - 18) Chaiyaphum
 - 19) Nakhonratchasima
 - 20) Buriram
 - 21) Sisaket
 - 22) Surin
 - 23) Ubonratchathani
 - 24) Yasothon
 - 25) Roiet
- 4 . Region
 - 26) Karasin
 - 27) Khonkaen
 - 28) Nakhonphanom
 - 29) Mahasarakham
 - 30) Loey
 - 31) Nongkhai
 - 32) Sakonnakhon
 - 33) Udonthani
 - 34) Mukdahan
- 5 . Region
 - 35) Chiengrai
 - 36) Chiengmai
 - 37) Nan
 - 38) Phayao
 - 39) Phrae
 - 40) Maehongson
 - 41) Lampang
 - 42) Lamphun

6 . Region

- 43) Kamphaengphet
- 44) Tak
- 45) Phitsanulok
- 46) Phichit
- 47) Phetchabun
- 48) Sukhothai
- 49) Nakhonsawan
- 50) Uthaithani
- 51) Uttaradit

7 . Region

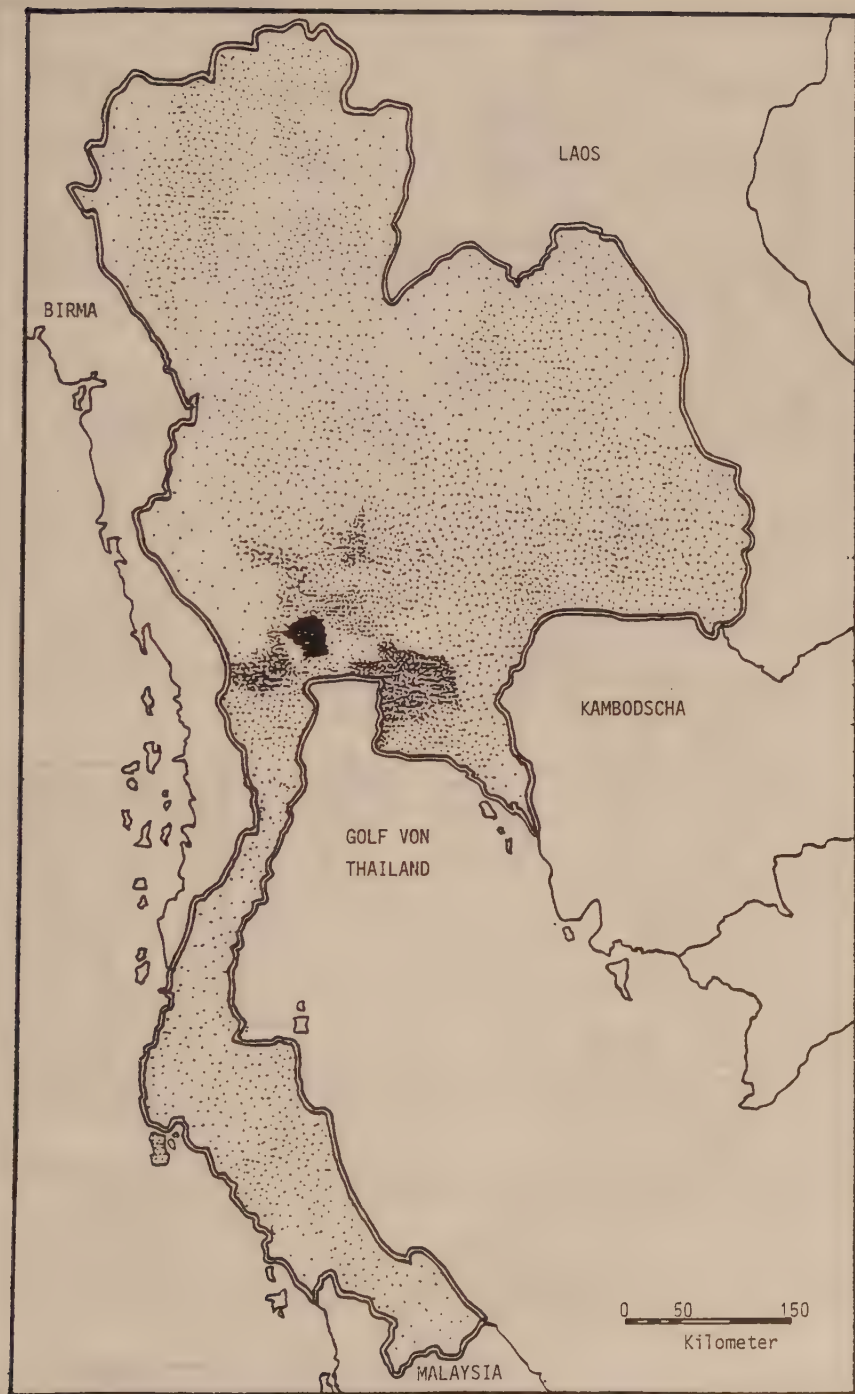
- 52) Kanchanaburi
- 53) Nakhonpathom
- 54) Prachuabkhirikhan
- 55) Phetburi
- 56) Ratburi
- 57) Samutsongkhram
- 58) Suphanburi
- 59) Samutsakhon

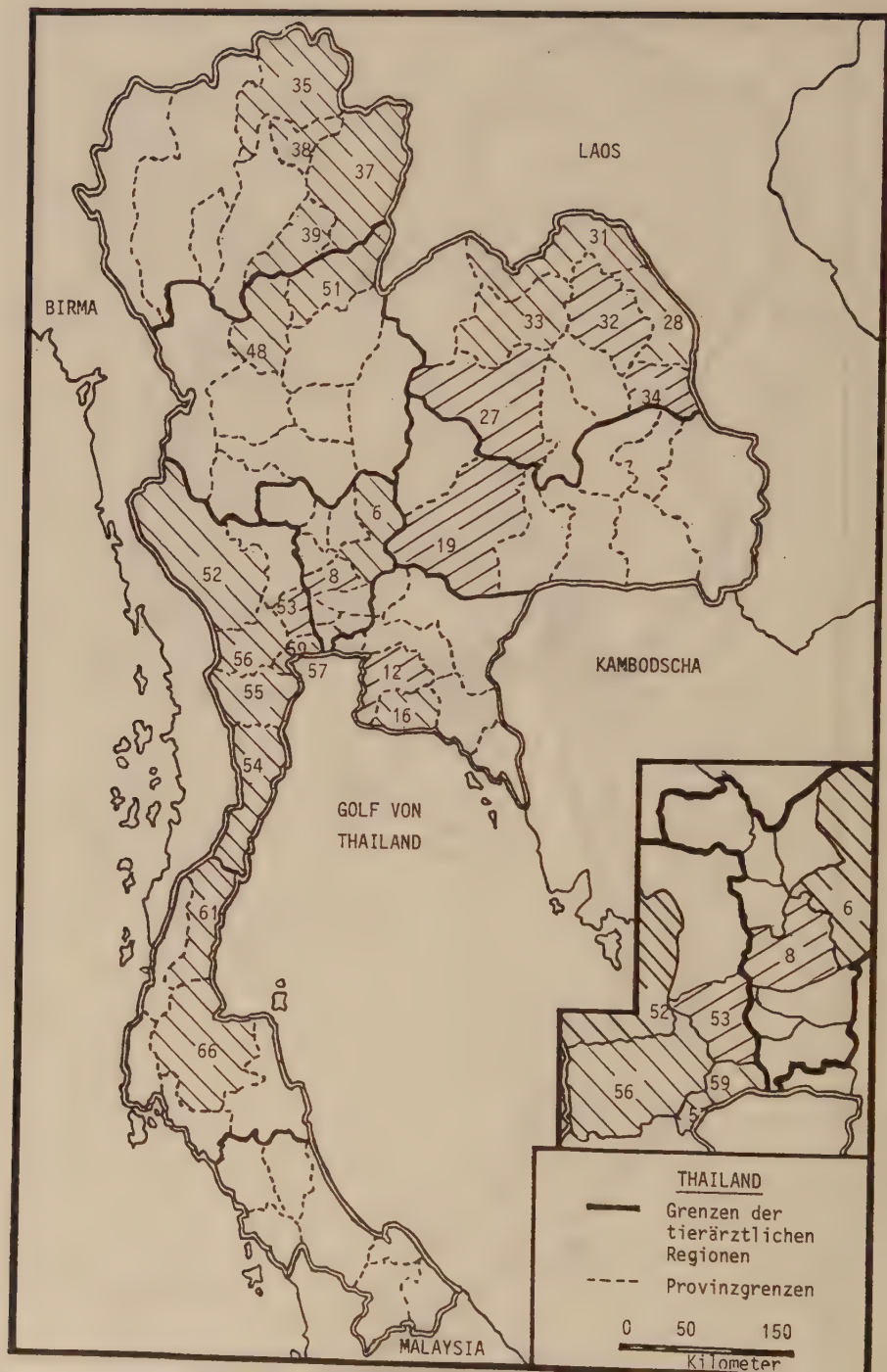
8 . Region

- 60) Krabi
- 61) Chumphon
- 62) Nakhonsithammarat
- 63) Phangnga
- 64) Phuket
- 65) Ranong
- 66) Suratthani

9 . Region

- 67) Trang
- 68) Narathiwat
- 69) Pattani
- 70) Phatthalung
- 71) Yala
- 72) Songkhla
- 73) Satun





7. Literaturverzeichnis

Adams, E. and R.P. Hanson, 1956: A procedure for adsorbing virus neutralizing antibodies in paper disks. J. Bact. 72: 572.

Afshar, A., P. Wright, and G. Dulac, 1986: Development and evaluation of an indirect enzyme immunoassay for detection of porcine antibodies to pseudorabies virus. Can. J. Vet. Res. 90: 422-426.

Afshar, A., F.C. Thomas, P.F. Wright, J.L. Shapiro, P.T. Shettigara, and J. Anderson, 1987: Comparison of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Bluetongue virus antibodies in serum and whole blood. J. Clin. Microbiol. 25: 1705-1710.

Anderson, R.I., E.H. Sadun, and J.S. Williams, 1961: A technique for the use of minute amounts of dried blood in the fluorescent antibody test for Schistosomiasis. Exp. Parasit. 11: 111-116.

Animal Epidemics Act, B.E. 2499, Ministry of Agriculture and Cooperatives (Thailand).

Antarasena, C., R. Wongwatcharadumrong and N. Choen-ngern, 1987: The outbreaks of Aujeszky's disease in swine in the southern part of Thailand. Thai J. Vet. Med. 17: 31-39.

Banks, M. and S. Cartwright, 1983: Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus. Vet. Rec. 2: 38-41.

Banks, M., 1985: Detection of antibodies to Aujeszky's disease virus in whole blood by ELISA disc. J. Virol. Meth. 12: 41-45.

Behring-Werke AG, Marburg, 1987, 1988: Informationen zum "Enzygnost-Aujeszky".

Bonin, O., 1973: Quantitativ-virologische Methodik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Briaire, J., R.H. Meloan, and S.J. Barteling, 1979: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against Aujeszky's disease virus in pig sera. Zbl. Vet. Med. B. 26: 76-81.

Bruce-Chwatt, L.J., C.C. Draper, and P. Konfortion, 1973: Seroepidemiological evidence of eradication of Malaria from Mauritius. Lancet 2: 547-551.

Burridge, M.J. and C.D. Kimber, 1973: Detection of antibodies to Babesia bigemina in dried blood samples using the indirect fluorescent antibody test. Ann. Trop. Med. Parasit. 67: 191-195.

Caillé, J.-Y., 1987: Serologische Untersuchung über Verbreitung und saisonales Vorkommen von Blutprotozoen bei verschiedenen Nutztieren in Somalia. Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Diss..

Chin, J., N.J. Schmidt, E.H. Lennette, and M. Hanahoe, 1966: Filter paper disc method of collecting whole blood for serologic studies in children. *Am. J. Epidem.* 84: 74-80.

Durham, P., H. Sillars, and F. Hobbs, 1985: Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and serum neutralisation test for the serodiagnosis of Aujeszky's disease. *N. Z. Vet. J.* 8: 132-135.

Eich, K., 1983: Die Aujeszky'sche Krankheit des Schweines. *Tierärztl. Praxis* 11: 323-330.

Eloit, M. et B. Toma, 1987: Dépistage de la maladie d'Aujeszky a l'aide de prélèvements sur papier filtre. *Journées Rech. Porcine en France.* 19: 183-188.

Engvall, E. and P. Perlmann, 1972: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantification of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 109:129-135.

Farzadegan, H., K.H. Noori, and F. Ala, 1978: Detection of Hepatitis-B surface antigen in blood and blood products dried on filter paper. *Lancet* 1: 362-363.

Forschner, E., H.D. Dopatka, J. Büniger, F. Behrens und K.H. Witte, 1981: Aujeszky'sche Krankheit der Schweine: Zur Einsatzmöglichkeit eines ELISAs für den Nachweis von virusspezifischen Serumantikörpern. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.* 88: 134-139.

Gerbermann, H., 1988: Persönliche Mitteilung, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim bei München.

Gustafson, D.P., 1975: Pseudorabies. In: H.W. Dunne and A.D. Leman (editors): *Diseases of swine*. 4th ed. Verlag Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA.

Hassane, H.M., 1983: Vergleichende Untersuchungen von Seren und Trockenblut (auf Filterpapier) experimentell mit Babesien infizierter Rinder und Ponies im ELISA und Stick-ELISA. *Tierärztl. Fakultät der Universität München, Diss..*

Hill, H.T., R.A. Crandell, C.L. Kanitz, J.P. McAdaragh, G.L. Seawright, R.F. Solorzano, and W.C. Stewart, 1977: Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnostic of Pseudorabies (Aujeszky's). *Am. Assoc. Vet. Lab. Diag.* 20: 375-390.

Iffa Merieux GmbH, Laupheim, 1988:
Informationen zum "Kit Latex Aujeszky".

Jahresbericht des Departments of Livestock Development,
Ministry of Agriculture and Cooperatives (Thailand), 1985: 15.

Kimber, C.D. and M.J. Burridge, 1972: The indirect fluorescent antibody test for experimental East Coast Fever (*Theileria parva* infection of cattle): evaluation of dried blood samples as a source of antibody. Res. Vet. Sci. 13: 133-135.

Kitt, T., 1982: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. 9. Aufl. Verlag F. Enke, Stuttgart.

Kongsmak, K., 1984: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for detecting antibody against Aujeszky's disease virus in pig sera. Proc. 11th Ann. Vet. Med. Confer., Thailand. 159-167.

Kongsmak, S., B. Sunyasootcharee, and P. Arjongsakoon, 1980: Isolation and identification of Aujeszky's disease virus by using cell culture. Thai J. Vet. Med. 10: 119-126.

Kortheerakul, K., P. Jullasap, and V. Thepsumethanone, 1984: Rabbit inoculation for diagnosis of Aujeszky's disease. Proc. 11th Ann. Vet. Med. Confer., Thailand. 479-480.

Kretzschmar, C. 1970: Die Aujeszky'sche Krankheit. Verlag G. Fischer, Jena.

Baron von Kruedener, R., 1985: National Foot and Mouth disease control in Thailand. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ). 6-50.

Lugovic, B., S. Cvetnic, D. Rapic, M. Lojkic, and J. Madic, 1987: Use of the immunoenzyme test (ELISA) in the diagnosis of Aujeszky's disease. Vet. Arch. 9: 213-217.

Mayr, A., G. Eißner und B. Mayr-Bibrack, 1984: Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin. Verlag Paul Parey, Berlin und Stuttgart.

Meier, K., 1982: Ein indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen Nairobi Sheep Disease-Virus. Tierärztl. Fakultät der Universität München, Diss..

Menz, I., 1979: Die Anwendung des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) bei der serologischen Diagnose der Sendaivirus- und Mycoplasmainfektion von Maus und Ratte. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss..

Moennig, V., P. Woldesenbet, H.-R. Frey, B. Liess, H.D. Dopatka und F. Behrens, 1981: Vergleichende Untersuchungen von Schweineseren mit einem Enzym-Immuntest (ELISA) und dem Neutralisationstest zur serologischen Diagnose bei der Aujeszký'schen Krankheit des Schweines. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 88: 357-359.

Moutou, F., B. Toma, and B. Fortier, 1978: Application of an enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of Aujeszký's disease in swine. Vet. Rec. 103: 264.

Nakane, P.K. and A. Kawaoui, 1974: Peroxidase-labelled antibody: A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091.

van Oirschot, J.T., H.J. Rziha, P.J.L.M. Moonen, J.M.A. Pol, and D. van Zaane, 1986: Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszký's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. J. gen. Virol. 67: 1179-1182.

van Oirschot, J.T., D.J. Houwens, H.J. Rziha, and P.J.L.M. Moonen, 1988: Development of an ELISA for detection to glycoprotein I of Aujeszký's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. J. Virol. Methods 22: 191-206.

Oliver, R.E., 1987: Evaluation of whole blood collected on to paper disc for the sero-diagnosis of Aujeszký's disease by ELISA. Surveillance 14:10.

Parchariyanon, S., W. Pinyochon, and U. Tantaswasdi, 1984: An application of fluorescent antibody technique in diagnosis of swine viral diagnosis. T. V. M. A. 35: 345-352.

Pinyochon, W., and S. Parchariyanon, 1983: Detection of antibody titer against Aujeszký's disease in swine by serum neutralization test. Proc. 2nd Ann. Livestock Confer., Thailand. 61-62.

Riengrojitak, S., S. Sahapong, B. Sunvasootcharee, and S. Angsubhakorn, 1982: Pseudorabies in Swine: an ultrastructural study. Thai J. Vet. Med. 12: 240-246.

Rodak, L., B. Smid, L. Valicek, and E. Jurak, 1987: Four-layer enzyme immunoassay (EIA) detection of differences in IgG, IgM and antibody responses to Aujeszký's disease virus in infected and vaccinated pigs. Vet. Microbiol. 13: 121-133.

Rolle, M. und A. Mayr, (Hrsg.) 1984: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Verlag F. Enke, Stuttgart.

Rubenstein, K.E., R.S. Schneider and E.F. Ullmann, 1972: "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 846-851.

Rustleben, W.-P., 1988: Vergleichende Untersuchung von Schweineseren auf Antikörper gegen das Virus der Aujeszky'schen Krankheit. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss..

Sander, J. und Ch. Niehaus, 1984: IgM-Enzym-Immuno-Screeningtest auf konnatale Röteln. Dtsch. Med. Wschr. 109: 1600-1603.

Satra, J., 1986: The comparison between two methods of ELISA technique for Aujeszky's disease. Proc. 13th Ann. Vet. Med. Confer., Thailand. 86-87.

Schulze, W., K. Bickhardt, W. Bollwahn, G. v. Mickwitz und H. Plonait, 1980: Klinik der Schweinekrankheiten. Verlag M. u. H. Schaper, Hannover.

Snyder, M.L. and W.C. Stuart, 1977: Applications of an enzyme labeled antibody test in pseudorabies. Proc. Americ. Assoc. Vet. Lab. Diagn. 20: 17-32.

Snyder, M.L., P.L. McMahon, E.F. Workman, C.L. Seymour, N.R. Forster, and H.T. Hill, 1985: An improved enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pseudorabies infection. Proc. Americ. Assoc. Vet. Lab. Diagn. 28: 383-396.

Statistic reports: Number of livestock in Thailand, Planning Division, Department of Livestock Development, Feb.-Apr. 1988.

Sunyasootcharee, B., P. Arjongsakoon, and M. Fuangfupongsa, 1978: A preliminary report on discovery of a disease resembling Aujeszky's disease in pig. T. V. M. A. 29: 1-11.

Sunyasootcharee, B., S. Kongsmak, and P. Arjongsakoon, 1980: Recent outbreaks of Aujeszky's disease in pigs with particular reference to laboratory diagnosis of clinical cases. Thai J. Vet. Med. 10: 102-118.

Sunyasootcharee, B., 1981: Immunology: Aujeszky's disease. Confer. Thai Vet. Med. Ass. under Royal Patronage, Bangkok, Thailand. 134-141.

Sunyasootcharee, B., 1982: Aujeszky's disease and Foot and Mouth disease in pigs in Thailand. Ann. Confer. of the S. V. M. A., Singapore, 21.

Sunyasootcharee, B., 1983: Control and eradication of Aujeszky's disease in infected swine herds. Proc. 2nd Ann. Livestock Confer., Bangkok, Thailand. 276-280.

Tanticharoenyos, T., A. Leunrungsi, L. Muliga, W. Pinyochon, C. Mekgamol, S. Sutherat, and P. Chindavanig, 1981: Study and diagnosis of Pseudorabies in swine at Nakhonpathom. T. V. M. A. 32: 243-253.

Toma, B., M. Eloit, et P. Tilmant, 1986: Sérodiagnostic de la maladie d' Aujeszky utilisation de prélèvements de sang sur papier filtre. Rec. Méd. Vet. 162: 1111-1117.

Verordnung zum Schutz gegen die Aujeszky'sche Krankheit vom 30. April 1980 (BGBl. I, S. 488), in der derzeit gültigen Form vom 21. April 1983 (BGBl. I, S. 1287).

Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Bartlett, 1979: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe, Guernsey.

van Weemen, B.K. and A.H.W.M. Schuurs, 1971: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Letters 15: 232-237.

Wilson, S. and J.A. Schipper, 1983: Pseudorabies antibody screening with Latex-Macroagglutination. Proc. 3rd Int. Symp. World Assoc. Vet. Lab. Diag. USA, 215-219.

Wittmann, G., G. Bartenbach, and J. Jakubik, 1982: Cell-mediated immunity in Aujeszky disease virus infected pigs. 1. lymphocyte stimulation. Arch. Virol. 50: 215-222.

Wittmann, G., 1984: Problematik der Schutzimpfung gegen Aujeszky'sche Krankheit. Tierärztl. Umsch. 3: 169-172.

Wittmann, G., 1986: Lebendimpfstoffe gegen die Aujeszky'sche Krankheit. Tierärztl. Umsch. 41: 641-652.

Wittmann, G., K. Bauer, C. Commichau, J.W. Frost, W. Glende, J. Hentschke, K. Koch, H. Liebke, R. Schawel und U. Wernery, 1987: Untersuchungen zur Vereinheitlichung des Neutralisationstestes zur Diagnose der Aujeszky'schen Krankheit. Tierärztl. Umsch. 42: 41-50.

van den Woldenberg, H.J., 1985: Darstellung der unterschiedlichen Seuchenlage und Bekämpfungsmöglichkeiten der Aujeszky'schen Krankheit in Niedersachsen. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

Wolde Senbet, P., 1982: Vergleichende serologische Untersuchungen mit dem Neutralisationstest und dem Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Aujeszky'scher Krankheit (AKV). Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss..

Worth, R.M., 1964: The filter disc blood collection method adapted for a Mumps HAI serologic survey. Am. J. Hyg. 79: 245-249.

Yalow, R.S and S.A. Berson, 1959: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184: 1648-1649.

Zhuang, H., A.G. Coulepis, S.A. Locarnini, and I.D. Gust, 1982: Detection of markers of Hepatitis B infection in serum dried on to filter-paper: an application to field studies. Bull. W.H.O. 60: 783-787.

Zoulek, G., P. Bürger, and F. Deinhardt, 1985: Markers of Hepatitis viruses A and B: direct comparison between whole serum and blood spotted on filter-paper. Bull. W.H.O. 63: 935-939.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. R. Gothe danke ich vielmals für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. E. Munz gilt mein besonders herzlicher Dank für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Seine jederzeit großzügig gewährte und freundliche Anleitung und seine Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit waren mir eine unersätzbliche Hilfe.

Für die Genehmigung und Unterstützung der Probensammlung in Thailand und die freundlichen Beratung möchte ich mich bei Herrn Dr. Tim Bhannasiri, ehemaliger Direktor General und Herrn Dr. Piya Aranyakananda, ehemaliger Vize-Direktor General des Departments of Livestock Development in Thailand, bedanken. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des DLDs, die mir beim Sammeln der Proben geholfen haben.

Die für die Durchführung des ELISA-Testes bzw. des Latexagglutinations-Testes verwendeten Materialien wurden freundlicherweise von den Firmen Behring bzw. Iffa Merieux zur Verfügung gestellt. Ich möchte mich an dieser Stelle hierfür ganz herzlich bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Präsident Dr. Koduro für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die Materialien bei der Durchführung des SNTs im Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Reg. Vet. Dir. Dr. H. Gerbermann vom Landesuntersuchungsamt und seinen Mitarbeitern für ihre freundliche Hilfe bei der Durchführung des SNTs meinen herzlichen Dank auszudrücken.

Bei Herrn M. Reimann möchte ich mich sehr herzlich für seine wertvollen Anregungen und seine geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. I. Renner-Müller für ihre bereitwillige und freundliche Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. W. Pfahler danke ich vielmals für seine Einführung in die virologischen Arbeitsmethoden und seine Vorschläge bei der Durchführung meiner Versuche.

Für die Vorversuche wurde mir Schweineblut durch Herrn Dr. K. Heinritzi, Medizinische Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Universität München zur Verfügung gestellt. Ich danke ihm hierfür an dieser Stelle vielmals.

Herrn Dr. G. Weiland danke ich für seine hilfreichen Ratschläge zur Durchführung der serologischen Vorversuche.

Die Durchführung der Arbeit wurde dankenswerterweise durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes ermöglicht.

LEBENS LAUF

NAME: Pisamai Leamcharaskul

GEBURTSTAG: 22.02.1959

GEBURTSORT: Bangkok, Thailand

ELTERN: Aran Leamcharaskul, Rentner
Atchana Leamcharaskul, Hausfrau

SCHULE: 1963-1974
Elementarschule und Mittelschule
Sahapanich Schule in Bangkok, Thailand
1974-1976
Gymnasium
Sainampung Schule in Bangkok, Thailand

STUDIUM: 1977-1983
Studium der Veterinärmedizin
Kasetsart Universität in Bangkok, Thailand
21.03.1981 Bachelor Degree of Science
12.03.1983 Doctor of Veterinary Medicine

TÄTIGKEITEN: 1983-1986
Tierärztin
im Zentrum zur MKS-Impfstoffherstellung
der Abteilung für Veterinärbiologie des
Departments of Livestock Development des
Ministeriums für Landwirtschaft und
Kooperative, Pakchong in Nakhonratchasima

STIPENDIUM ab April 1986 durch den DAAD (Deutscher
Akademischer Austauschdienst)

DEUTSCHKURSE: 20.04.1986-27.09.1986 am
Goethe-Institut in Freiburg und vom
29.10.1986-04.07.1987 Teilnahme am
Deutschkurs für Ausländer, LMU München

KENNTNISPRÜFUNGEN (entsprechend § 4 der Promotionsordnung der
Tierärztlichen Fakultät der Universität
München, BRD):
24.08.1987
Allgemeine Infektions-und Seuchenlehre
6.10.1987
Allgemeine Pathologie

DURCHFÜHRUNG DER
VORLIEGENDEN
ARBEIT: Oktober 1987-Juli 1989

